

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Jan Eliáš

Struktura a fyziologický význam mitochondriálního póru přechodné
propustnosti

Structure and physiological role of the mitochondrial permeability transition
pore

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce:

RNDr. Tomáš Mráček, Ph.D.

Praha, 2020

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Tomáši Mráčkovi, Ph.D. Za odborné konzultace, za jeho trpělivost a nadšení pro danou problematiku. Rád bych také poděkoval Barboře Šrámkové za to, že mě seznámila s ilustračními programy.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.08.2020

Jan Eliáš

Abstrakt

Mitochondriální pór přechodné propustnosti (mPTP) je Ca^{2+} dependentním kanálem nacházejícím se ve vnitřní mitochondriální membráně, který je inhibován nanomolárními koncentracemi imunosupresiva cyklosporinu A. Společně s dalšími interagujícími proteiny, které regulují jeho otevření, utváří mPTP proteinový komplex přechodné propustnosti. Přetrvávající otevření mPTP je doprovázeno bobtnáním mitochondrií a následným kolapsem organely, jež předchází vyplavení proapoptotických proteinů a programované buněčné smrti. Kanál utvářející proteinová jednotka mPTP zůstává i přes intenzivní dlouholetý výzkum neznámá. Napříč historií zkoumání mPTP byl za kanál utvářející jednotku přijímán proteinový komplex ANT-VDAC, samotný protein ANT, PiC i ATP syntáza. I přes skutečnost, že nám doposud není známa přesná strukturní podstata, je mPTP přisuzována role v celé řadě onemocnění a patofyziologických stavů s nimi spojenými. Patří mezi ně zejména role v ischemickém/reoxidačním poškození, nervových a svalových dystrofiích i v nádorovém bujení.

Klíčová slova:

mitochondrie, mitochondriální pór přechodné propustnosti, cyklosporin A, programovaná buněčná smrt, ATP syntáza, oxidačně fosforylační aparát.

Abstract

Mitochondrial permeability transition pore (mPTP) is Ca^{2+} dependent channel localised in the inner mitochondrial membrane. One of its defining characteristics is inhibition by nanomolar concentrations of immunosuppressant cyclosporine A (CsA). Together with additional interacting proteins, which regulate its opening, mPTP forms a permeability transition protein complex. Persistent opening of mPTP is accompanied by mitochondrial swelling and a subsequent collapse of organelle, which precedes release of proapoptotic proteins and programmed cell death. Channel forming unit of mPTP remains unknown, despite intense and long-lasting study. Numerous proteins were proposed to play a role of channel forming subunit of mPTP, including complex of ANT and VDAC, ANT alone, PiC or even ATP synthase. Despite the fact, that molecular structure remains elusive, mPTP seems to play a role in a range of pathophysiological processes or diseases associated with them. Among others this includes ischemia/reperfusion injury, neurological and muscle dystrophies, or tumorigenesis.

Keywords:

mitochondria, mitochondrial permeability transition pore, cyclosporine A, programmed cell death, ATP synthase, oxidative phosphorylation apparatus.

Seznam zkratek

ADP – adenosindifosfát

AIF – apoptózu indukující faktor

als – amyotrofická laterální skleróza

ANT – translokátor adeninových nukleotidů

ATP – adenosintrifosfát

ATR – atractylosid

BAK – BCL-2 homologní antagonista/zabiják

BAX – s BCL-2 asociovaný X protein

BCL-2 – genová rodina u B lymfomů

BKA – bongkreát

BZ-423 – benzodiazepin-423

CAT – karboxyatraktylát

CsA – cyklosporin A

Cyp-D – cyklofilin-D

Cyp-N – cyklofilin-N

DNA – deoxyribonukleová kyselina

HAP1 – model lidských buněk s haploidním genomem

IMM – vnitřní mitochondriální membrána

IMS – mezimembránový prostor

KO – knockout

mCICR – mitochondriální vápníkově závislé vypuštění vápníku

mtDNA – mitochondriální DNA

mPTP – mitochondriální pór přechodné propustnosti

MCC – multikonduktanční kanál

MMC – mitochondriální megakanál

MOMP – permeabilizace vnější mitochondriální membrány

NADH/NAD⁺ – nikotinamidadenindinukleotid

OMM – vnější mitochondriální membrána

OSCP – protein zprostředkovávající sensitivitu k oligomycinu

OXPHOS – oxidačně fosforylační aparát

$\Delta\psi$ – protonový gradient

PCD – programovaná buněčná smrt

PGO – fenylglyoxalát

P_i – fosfát

PiC – fosfátový přenašeč

PT – přechodná propustnost

PTPC – proteinový komplex přechodné propustnosti

ρ^0 – buněčný model ve kterém chybí mitochondriální DNA

ROS – reaktivní formy kyslíku

SLC-25 – soluty přenášející rodina 25

TSPO – mitochondriální benzodiazepinový receptor

VDAC – napětově závislý aniontový kanál

Obsah

Úvod	1
1. Mitochondrie.....	2
2. Historické kořeny výzkumu PTP/MMC.....	3
2.1 Rané pokusy na mitochondriích	3
2.2 Charakterizace PT a klíčové objevy.....	4
3. Proteinový komplex mPTP (PTPC).....	6
3.1 ANT jako centrální komponenta mPTP	9
3.2 Modely funkce ANT	12
3.3. ANT inaktivované modely	13
4. PiC jako hlavní konstituent mPTP	14
4.1 Model funkce PiC ve fenoménu PT	14
4.2 Experimenty v rozporu s PiC modelem.....	14
5. ATP Syntáza.	15
5.1 ATP syntáza jako channel forming unit mPTP.....	15
5.2 Výzkum Vlivu ATP syntázy na pór přechodné propustnosti.	17
5.3 Studie proti F-ATP syntázovému modelu	19
5.4 Současnost mPTP	20
6. Fyziologický význam mPTP	21
6.1 Permeabilizace vnější mitochondriální membrány	21
6.2 Navození PCD	22
6.3 Regulace mPTP a jeho konduktanční stavy.....	22
6.4 Role v patofyziologii.	23
Závěr	27
Seznam použité literatury.....	28

Úvod

V předkládané bakalářské práci se zabývám fyziologickou úlohou a strukturou mitochondriálního póru přechodné propustnosti.

Mitochondriální pór přechodné propustnosti (mPTP) je pór, nacházející se na vnitřní mitochondriální membráně (IMM), vyznačující se vysokou konduktancí. mPTP je aktivován vysokými koncentracemi vápenatých kationtů a inhibován cyklosporinem A (CsA). Otevření mPTP má za následek zvýšení propustnosti vnitřní mitochondriální membrány. Stav navozený po otevření mPTP je nazýván stavem PT (Permeability Transition), neboli stavem přechodné propustnosti. Tento proces zvýšení permeability umožňuje průchod solutů do velikosti 1500 Da.

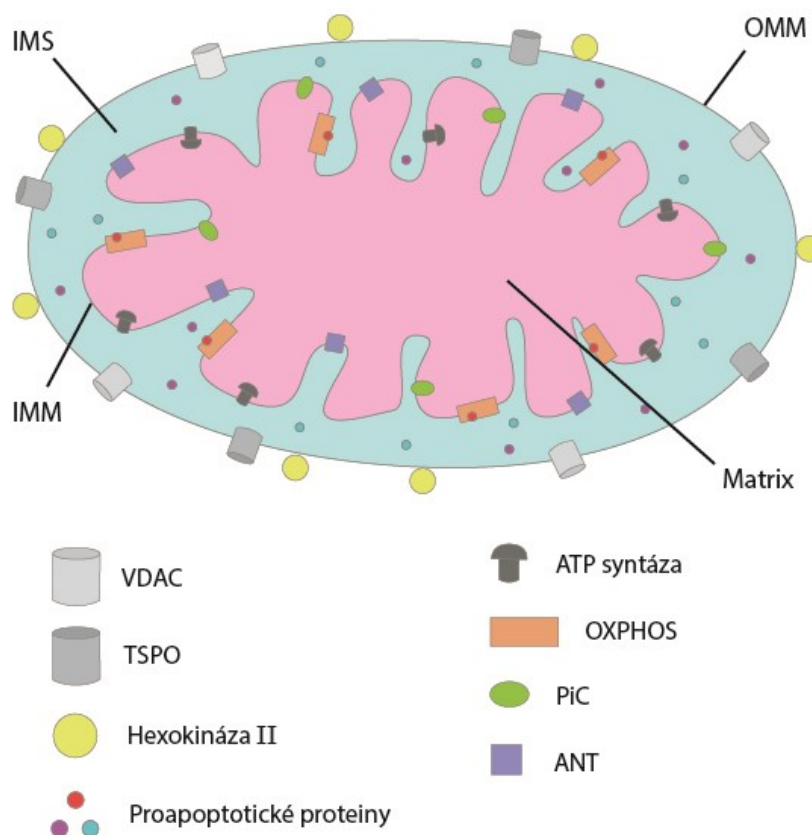
Stav přechodné propustnosti byl v počátečních fázích výzkumu považován za *in vitro* artefakt vznikající v laboratorních podmínkách během procesu izolace mitochondrií. Další výzkum ale nakonec vedl k tomu, že mPTP je již vnímán jako integrální součást procesů programované buněčné smrti a nekrózy. Při vápníkem způsobeném otevření mPTP je stav přechodné propustnosti následován bobtnáním mitochondrií a depolarizací vnitřní mitochondriální membrány, která je zapříčiněna vyrovnáním koncentrací solutů do velikosti 1500 Da mezi matrix a mezimembránovým prostorem. Tento stav posléze vede k celkovému kolapsu organely, prasknutí vnější mitochondriální membrány (OMM) a uvolnění mitochondriálních proapoptotických proteinů, včetně cytochromu C, do cytosolu.

Problematika objasnění skutečné struktury póru přechodné propustnosti je záležitostí složitou a kontroverzní. PT je objektivně pozorovaný fenomén, nesmírně zvláštní na celé problematice ale je, že tomuto dlouhodobě sledovanému fyziologickému jevu chybí objasněná strukturní, biologická podstata. To platí i přes to, že jsou o struktuře mPTP mezi jednotlivými tábory vědců vedeny letité debaty. Proto jsem si jako cíl své bakalářské práce vytyčil shrnutí a diskusi hlavních hypotéz o struktuře mPTP a nastínění role mPTP a jeho mechanismů v rámci fyziologie. Motivací pro mou bakalářskou práci byla především přetrvávající nejasnost poznatků na tomto poli, jelikož detailní porozumění této problematice může mít pozdější uplatnění v patofyziologii.

1. Mitochondrie

Mitochondrie jsou semiautonorními buněčnými organelami, jež hrají ústřední roli v mnoha buněčných procesech. Nejvýznamnějším mitochondriálním procesem je tvorba protonového gradientu ($\Delta\psi$) pomocí elektron transportního řetězce proteinů nacházejících se v IMM a následné využití $\Delta\psi$ k syntéze ATP pomocí enzymu ATP syntázy (Papa et al. 2012). Dalšími procesy jsou pak regulace vápníkové signalizace (Rizzuto et al. 1993) a centrální role ve spouštění programované buněčné smrti (Liu et al. 1996). Je všeobecně známo, že mitochondrie slouží jako buněčný kompartment, ve kterém probíhají životně důležité biochemické procesy, mezi něž dále patří Krebsův cyklus, beta oxidace mastných kyselin a rovněž role v syntézách železo-sirných center užívaných u širokého spektra proteinů.

Mitochondrie disponují dvěma membránami, vnější (OMM) a vnitřní (IMM). Mitochondriální struktura je za fyziologických podmínek velmi dynamická. Dochází u nich k neustálému štěpení a jejich fúzi za účely regulace mitochondriálních procesů a jejich účinné subkompartmentalizaci a vnitrobuněčné lokalizaci (Bereiter-Hahn a Vöth 1994; Dimmer a Scorrano 2006).



Obrázek 1: Zjednodušená ilustrace mitochondrie s pospanou vnější membránou (OMM), mezimembránovým prostorem (IMS), vnitřní membránou (IMM), mitochondriální matrix a s proteiny diskutovanými dále v práci.

V případě, že mitochondrie za dobu své existence naakumuluje velké množství poškození, či je organismus vystaven kalorické restrikci, jsou tyto poškozené a nefunkční mitochondrie odbourávány autofagickými procesy (Terman a Brunk 2004), převládne-li dramaticky počet poškozených mitochondrií, spustí se kaskáda buněčných procesů na jejichž konci dojde ke spuštění programované buněčné smrti (Kroemer, Galluzzi, a Brenner 2007). V současné době je již mitochondriální úloha v programované buněčné smrti (PCD) a patofyziologické stavy s ní spojeny přisuzovány mitochondriálnímu póru přechodné propustnosti.

2. Historické kořeny výzkumu PTP/MMC

2.1 Rané pokusy na mitochondriích

Během 50. let minulého století započaly na vědeckém poli první kroky studia mitochondrií, které byly spojeny mimo jiné i s prvními pokusy o jejich izolaci. Bylo zaznamenáno, že vlivem rozličných podmínek během mitochondriální izolace podstoupily mitochondrie proces bobtnání (swelling) (Raaflaub 1953), doprovázený zvýšením permeability IMM a nemožností fosforylovat ATP. (Hunter a Ford 1955). Mitochondriální swelling byl stimulován vyššími koncentracemi Ca^{2+} (Tapley 1956), P_i , mastnými kyselinami a inhibován přítomností ADP, Mg^{2+} a kyselým pH (Azzone a Azzi 1965; Lehninger 1959; Lehninger a Remmert 1959; Slater a Cleland 1953).

Proces mitochondriálního bobtnání byl zpočátku považován za nevýznamný fenomén vyskytující se pouze *in vitro*, jenž je s nejvyšší pravděpodobností zaviněn aktivací Ca^{2+} senzitivních fosfolipáz, které svou aktivitou poté permeabilizují IMM (Scarpa a Lindsay 1972).

Tento stav byl vnímán jako artefakt, díky tomu bylo snahou optimalizovat složení médií tak, aby k mitochondriálnímu bobtnání docházelo co nejméně. To vedlo k používání měrných médií podporujících navození podmínek, při kterých dochází k acidifikaci mitochondriální matrix a obsahujících chelatační činidla, která vyvazují dvojmocné kationty a tím snižují hladinu Ca^{2+} potřebných k indukci bobtnání (Nicolli, Petronilli, a Bernardi 1993; Bernardi 1992).

Bylo zjištěno, že mitochondriální substráty dýchacího řetězce, odvozené od NADH/NAD⁺, taktéž podporují akumulaci vápenatých iontů a následnou inhibici dýchání spojenou se zvýšením permeability membrány a únikem vápníku ven z mitochondriální matrix. V měrných médiích se proto začal užívat jako substrát sukeinát, který nevyžaduje přítomnost NADH/NAD⁺ a rovněž inhibitor komplexu I – rotenon (Vinogradov, Scarpa, a Chance 1972). Později se ukázalo, že přítomnost toku elektronů přes komplex I také usnadňuje aktivaci vápníkem indukovaného procesu zvýšené permeability (Li et al. 2012; Fontaine et al. 1998).

Ačkoliv názor, že mitochondriální bobtnání je *in vitro* artefakt vznikající při mitochondriální izolaci, převládal, nalezlo se několik výzkumných skupin, které u nově objeveného fenoménu hledaly možné uplatnění na poli patofyziologie. Velmi záhy bylo navrženo, že bobtnáním způsobený únik NADH/NAD⁺ může hrát roli ve steroidogenezi (Pfeiffer, Kuo, a Tchen 1976). Únik NADH/NAD⁺ byl v předchozí studii zaznamenán i bez detekce swellingu (Vinogradov, Scarpa, a Chance 1972).

2.2 Charakterizace PT a klíčové objevy

Podrobnou charakterizaci fenoménu vápníkem indukované permeability IMM provedli Hunter a Haworth ve své třídlínné studii. Tento proces byl pojmenován jako stav přechodné propustnosti (PT) na jehož konci dochází k procesu bobtnání.

Tyto zásadní práce poprvé definovaly charakteristiky mPTP tak, jak jsou dodnes přijímány:

- i) Propustnost přes IMM je navozena zkratováním
- ii) K aktivaci procesu PT je za potřebí Ca²⁺ nacházející se v matrix, které se váže na vnitřní vazebné místo v IMM. Ca²⁺ ionty kompetují s Mg²⁺ o stejné vazebné místo. Vápník také inhiboval oxidaci NADH nukleotidů.
- iii) Během procesu PT bylo zaznamenáno propouštění solutů do velikosti 1500Da (Mw 1000)

Tyto objevy během charakterizačního procesu dovedly autory k předložení návrhu, že proces PT je zapříčiněn otevřením proteinového, hydrofilního póru přítomného v IMM. Tento pór byl pojmenován mitochondriální pór přechodné propustnosti (mPTP) (Hunter a Haworth 1979a; Haworth a Hunter 1979; Hunter a Haworth 1979b).

2.2.1 Ptp je inhibováno CsA, hledání vazebného partnera.

Významnou podporou tohoto návrhu bylo zjištění, že únik vápníku a mitochondriální respiraci lze inhibovat pomocí nanomolárních koncentrací cyklosporinu A, imunosupresiva, které se využívá zejména po transplantacích (Fournier, Ducet, a Crevat 1987; Crompton, Ellinger, a Costi 1988). Další studie provedená na mitochondriích z krysích jater rovněž demonstrovala úspěšnou inhibici bobtnání pomocí přídatku CsA. Za zmínku rovněž stojí, že CsA neinhibovala proces akumulace vápníku v mitochondrii (Broekemeier, Dempsey, and Pfeiffer 1989).

Očekávalo se, že CsA, jako malá molekula bude s nejvyšší pravděpodobností vázána do vazebného místa membránového póru proteinové povahy, či bude vázán na partnera, jenž s takovým proteinem interaguje. Následné studie tudíž směřovaly k hledání vazebného partnera CsA. Byla odhalena jeho vazba k cyklofilinu-D (Cyp-D) (Nicolli et al. 1996). Neméně

důležitým poznatkem také je, že při vyšším oxidačním stresu byla zaznamenána vyšší míra vazby Cyp-D k IMM. Tato vazba byla inhibována ošetřením vzorku cyklosporinem A (Connern a Halestrap 1994).

Cyp-D je peptidyl-prolyl cis-trans izomeráza, jenž se řadí mezi důležité mitochondriální chaperony, který má kromě zjištěného zprostředkování citlivosti mPTP k CsA také roli v regulaci oxidačně fosforylačního řetězce, je schopen cis-trans izomerázové aktivity a rovněž působí v mitochondrii jako tzv. scaffold protein (Porter a Beutner 2018).

2.2.2 MMC a patch clamp experimenty

Pomocí patch-clamp metod se definitivně podařilo prokázat existenci membránových kanálů v IMM. Možnost existence kanálu v IMM byla do té doby přijímána s nevolí. Přítomnost kanálu by nezbytně byla doprovázena značným zkratováním membránového potenciálu a výrazným snížením účinnosti oxidační fosforylace, což bylo v rozporu s tehdejšími chápáním chemiosmotické teorie. Teprve bližší porozumění této problematice napomohlo k nárůstu zájmu na tomto poli (Mitchell 1979). První studie objevily kanál o vodivosti 107 pS (Sorgato, Keller, a Stühmer 1987). Následné publikace poté popsaly existenci hned několika kanálů, jejichž naměřené konduktance se pohybovaly v rozmezí od 45 do 1000 pS (Kinnally, Campo, a Tedeschi 1989).

Hlavní objev však provedla skupina I. Szabó, která zaznamenala přítomnost mitochondriálního megakanálu o naměřené konduktanci až 1,3 nS. Kanál rovněž zaujímal mezistavy o menší konduktanci pohybující se okolo 300 pS (Petronilli, Szabó, a Zoratti 1989). Kanál získal název MMC (z angl. Mitochondrial mega channel), nebo MCC (z angl. Multi conductance channel). Tento kanál, měřený na mitoplastech (mitochondriích zbavených OMM) z krysích jater, podléhal inhibici CsA ve stejné koncentraci, jako tomu bylo u nově charakterizovaného mPTP, jeho odpověď na známé modulátory byla rovněž stejná. Tato fakta dovedla autory postupně k závěru, že MMC a mPTP jsou stejnými molekulárními entitami (Szabó a Zoratti 1992).

Kromě samotné existence membránového kanálu skupina rovněž zjistila, že jeho modulační místo se nachází na matrix straně membrány (Szabo a Zoratti 1991). Kinetický charakter póru již v rané fázi napověděl, že pór bude velmi pravděpodobně tvořen z několika proteinových podjednotek (Szabo, Bernardi, a Zoratti 1992). Na tyto studie navázala série elektrofyziologických experimentů typu single channel, jejichž výsledky poprvé navrhy, že kanálová aktivita je spojena s proteinem ANT (Szabo, Bernardi, a Zoratti 1992).

Tato série zlomových objevů odstranila dosavadní nevoli a odměřenost vědecké obce k tomuto poli, v důsledku čehož se o fenomén přechodné propustnosti a jeho roli v patofyziologii začalo zajímat více laboratoří. V této době již bylo navrženo, že mPTP může mít roli v PCD (Crompton a Costi 1988). Význam mPTP v patofyziologii bude shrnut v kapitole 6.

3. Proteinový komplex mPTP (PTPC)

V návaznosti na první charakterizační studie, které vymezily základní charakteristiky póru, nastal čas objasnění jeho strukturní podstaty. Původní práce, které poukazovaly na spojitost kanálové aktivity s proteinem ANT díky stejným inhibitorům (D. R. Hunter a Haworth 1979a; Haworth a Hunter 1979; D. R. Hunter a Haworth 1979b), vazbou CypD (Woodfield et al. 1998; Crompton, Virji, a Ward 1998), i podpora tohoto tvrzení pomocí elektrofyziologických metod (Szabo, Bernardi, a Zoratti 1992) odstartovaly další sérii bádání, jejichž hlavním předmětem byl protein ANT a proteinové komponenty běžně s ním asociované. Začalo se uvažovat, že samotný pór je tvořen hned celým komplexem proteinů. Předpokládané složky proteinového komplexu byly:

a) ANT: ANT je protein nacházející se ve vnitřní membráně mitochondrie spadající do rodiny proteinů SLC25, jehož hlavní úlohou je výměna adeninových nukleotidů (ADP/ATP) mezi matrix a mezimembránovým prostorem mitochondrie. Kinetika přenosu adeninových nukleotidů je velmi pomalá v důsledku velikosti ATP, které patří k největším substrátům, které jsou translokázy rodiny SLC25 schopny transportovat. Nároky na vysokou rychlost přenosu jsou na mitochondriální membráně kompenzovány abundancí tohoto proteinu (Klingenberg 2008).

V rané fázi výzkumu byl navrhnout protein ANT jako možný kandidát, jenž by mohl tvořit jednu z hlavních částí mPTP. Tuto hypotézu podporoval zejména fakt, že MMC i ANT jsou citlivé ke stejným modulátorům. Těmito inhibitory jsou látky atractylosid (ATR) a bongkreát (BKA), Obě látky inhibují translokázovou aktivitu ANT a každá stabilizuje ANT v opačné konformaci. První ze zmíněných podporuje otevírání mPTP a druhý jej inhibuje (D. R. Hunter a Haworth 1979a; Haworth a Hunter 1979; D. R. Hunter a Haworth 1979b).

Detailně je funkci ANT coby ústředního konstituentu mPTP věnována kapitola 3.2.

b) VDAC: VDAC je mitochondriálním proteinem vnější mitochondriální membrány, nesoucí hlavní podíl na zajištění propustnosti OMM (De Pinto a Palmieri 1992). Savčí genom kóduje

3 isoformy VDAC (Blachly-Dyson a Forte 2001), z nichž mutace v podobě vyřazení isoformy 2 je embryonálně letální (Cheng et al. 2003).

Experimenty s afinitní chromatografií odhalily specifickou vazbu Cyp-D k ANT i VDAC. Rovněž bylo zaznamenáno, že ANT i VDAC po rekonstituci do membrány tvořily póry, které po přidání Cyp-D byly senzitivní k inhibici CsA. (Crompton, Virji, a Ward 1998) Je ale nezbytné poznamenat, že případnou kontaminaci méně četným proteinem získaným z izolace nelze kompletně vyloučit.

Pokusy o navození PT reagenty se sulfhydrylovou skupinou dokázaly, že ke zprostředkování citlivosti mPTP k těmto reagentům je zapotřebí přítomnost OMM (Le-Quoc a Le-Quoc 1985). V této době byla rovněž potvrzena existence komplexů ANT-VDAC s mitochondriálním benzodiazepinovým receptorem (TSPO) v tzv. contact sites mitochondrie, tj. v místě, kde dochází k úzkému kontaktu vnější a vnitřní mitochondriální membrány (McEnery et al. 1992). Zoratti a Szabó ve své dvoudílné studii předložili návrh modelu mPTP, kdy membránový porin VDAC je jedním ze strukturních konstituentů mPTP. Jeho chování vedlo k návrhu, že vyšší naměřené konduktance, dosahující až 4 nS, reflektují kooperativní otevření dvou komponent mPTP. Předložený model navrhuje, že dimery ANT i VDAC Společně interagují na kontaktních místech mitochondrie (Szabó a Zoratti 1993; Szabó, Pinto, a Zoratti 1993). Proti tomuto modelu však svědčí skutečnost, že proces PT byl vyvolán i v nepřítomnosti Dimerické formy ANT (Costantini, Colonna, a Bernardi 1998).

Ideální potvrzení role VDAC v utváření kanálu by představoval KO model, během prvních pokusů o jeho vytvoření však vznikl problém s embryonální letalitou v důsledku inaktivace isoformy 2 (Cheng et al. 2003).

Další snahu o rozluštění úlohy VDAC v roli mPTP přinesl chemický screening všech inhibitorů mPTP, kdy byl odhalen nový inhibitor Ro 68-3400, jenž inhiboval mPTP svou vazbou k proteinu o velikosti 32 KDa. Tento protein byl identifikován jako isoforma 1 proteinu VDAC (Cesura et al. 2003). Ačkoliv byl v původní publikaci protein o velikosti 32 KDa identifikován jako isoforma 1, navazující publikace toto tvrzení označuje za chybné, neboť u VDAC 1 (-/-) myši byla prokázána prevalence 32 KDa proteinu. Analýzy rovněž vyloučily roli dalších isoform VDAC v inhibici ligandem Ro 68-3400. O jaký protein se ve skutečnosti jedná tak zůstává záhadou. VDAC 1 tudíž není terčem inhibice Ro ligandem (Krauskopf et al. 2006). Následující experiment na fibroblastech se všemi inaktivovanými isoformami VDAC 1,2 a 3 rovněž neodhalil žádné změny. Byl zaznamenán běžný únik

cytochromu c, neméně zajímavá byla i zaznamenaná odpověď k proteinům BAX a BCL-2. K indukci PCD za pomoci BAX proapoptotických proteinů ani pomoci oxidačního stresu nebylo VDAC zapotřebí. Rovněž charakter indukce PTP nejevil žádné změny (Baines et al. 2007).

- c) **TSPO:** Translocator protein (TSPO) je protein vyskytující se na vnější mitochondriální membráně, jenž je schopen vázat benzodiazepin. Tento protein hraje roli v celé řadě buněčných procesů, od biosyntézy cholesterolu až po ovlivňování mitochondriální respirace a buněčného dělení (Denora a Natile 2017).

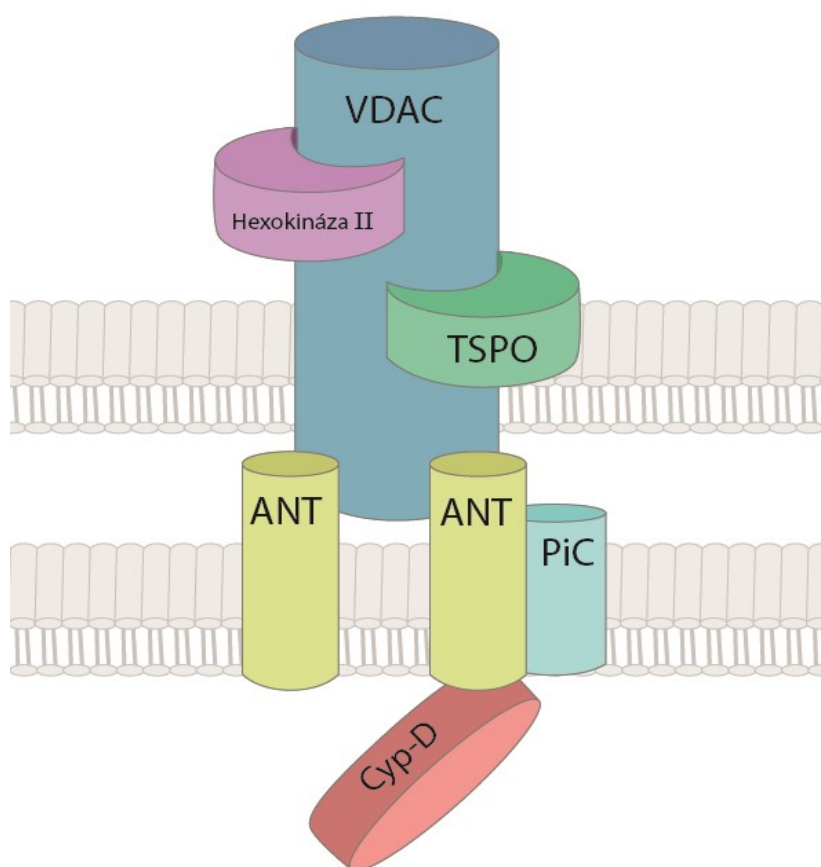
TSPO bylo do modelu multiproteinového komplexu mPTP zahrnuto na základě své přítomnosti v contact sitech (McEnery et al. 1992), zejména pak poté, co bylo demonstrováno, že jeho ligandy mohou ovlivnit chování kanálu (Kinnally et al. 1993).

Regulační úloha TSPO však zůstává nejasná, neboť ligandy TSPO byly schopné ovlivnit mPTP v mitoplastech, které postrádají vnější membránu a tudíž by neměly obsahovat ani TSPO (Kinnally et al. 1993). Za zmínku rovněž stojí, že byly zaznamenány různé odpovědi na stejný ligand TSPO napříč buněčnými typy: aktivační (Stanhope et al. 2001) i inhibiční (Parker et al. 2002). Různé odpovědi byly zaznamenány i v rámci jednoho buněčného typu (Bono et al. 1999). Od úvah o zapojení TSPO v mPTP bylo upuštěno poté, co byl vytvořen myší model s inaktivovaným genem pro TSPO a mPTP u těchto myší stále odpovídalo na ligandy TSPO. Toto zjištění vedlo k závěru, že TSPO není třeba ke správnému utváření kanálu, ani v jeho samotné regulaci (Šileikyte et al. 2014). Nezodpovězená však zůstává otázka, na jaké komponenty se TSPO ligandy váží.

- d) **Hexokináza II:** Hexokináza je první enzym reakční dráhy glykolýzy, katalyzuje přeměnu glukózy na 6- fosfoglukózu za spotřeby ATP. V savcích tkáních rozeznáváme čtyři isoformy – I-IV (Robey a Hay 2006).

V počátečních fázích výzkumu byla potvrzena přítomnost hexokinázy v contact sites mitochondrie a práce věnující se proteinovému komplexu demonstrovaly mPTP podobné vlastnosti proteinového komplexu obsahujícího hexokinázy (Beutner et al. 1996). Během studií vlivů mPTP v patofyziologii bylo odhaleno, že hexokinázy mohou ovlivňovat otevírání mPTP díky ovlivňování míry oxidačního stresu. Hexokinázy totiž disponují antioxidantními účinky (Pantic et al. 2013). Pokud dojde k uvolnění hexokinázy z kontaktních míst na mitochondrii, zvýší se míra oxidačního stresu a jeho vlivem dojde k otevření mPTP (Machida, Ohta, a Osada 2006). Hexokináza II má také roli v tumorigenezi,

kdy je isoforma II v nádorech abundantní a má vyšší obrat glukózy (Mathupala, Ko, a Pedersen 2010). Díky tomu zvládají nádorové buňky přežít i v hypoxickém prostředí, kde ochranou před indukcí mPTP představuje snížená produkce ROS (Heiden, Cantley, a Thompson 2009). V současnosti je studováno, zda hexokináza moduluje mPTP přímo či nepřímo. V nejnovější studii *in vitro* bylo pak demonstrováno, že samotná disociace hexokinázy z kontaktních míst nebyla dostačující k indukcí mPTP (Pereira et al. 2020).



Obrázek 2: Zjednodušený model PTPC. Obrázek byl malován na podkladu ilustrace Massima Bonory (Bonora et al. 2015).

3.1 ANT jako centrální komponenta mPTP

Pro získání lepšího porozumění role ANT ve fenoménu přechodné propustnosti izoloval Brustovetsky a spol. ANT z mitochondrií kravského srdce, které následně rekonstruoval do liposómů a podrobil elektrofyziologickým patch-clamp experimentům. Výsledky z těchto měření podporovaly tvrzení, dle kterého ANT utváří vlastní kanál mPTP. naměřená data připomínala vlastnosti mPTP. Byl aktivován vápníkem a oxidanty, inhibován v přítomnosti ADP a CsA společně s Cyp-D (Brustovetsky a Klingenberg 1996).

Oprávněnou námitkou bylo, zda se naměřené údaje reflektují pouze funkcionalitu ANT, vzhledem k jeho abundanci v mitochondriální membráně bylo diskutováno, že purifikace ANT nebyla dostačující a měření mohlo být ovlivněno residuálními mitochondriálními proteiny. Elegantní řešení tohoto problému spočívalo ve využití ANT z houby *Neurospora Crassa*, které bylo izolováno z inkluzních tělísek bakterií *E.Coli*. Volba tohoto postupu znemožnila jakoukoliv kontaminaci mitochondriálními proteiny, které mohly být přítomny v předchozích experimentech využívajících purifikované ANT z kravského srdce. Savčí protein naneštěstí nemohl být ve své době použit z důvodu velké odlišnosti preference kodonů ve zvoleném expresním systému. (Brustovetsky et al. 2002) V současné době již existují prostředky, které by expresi savčího ANT v *E.Coli* umožnily, ale bohužel, se o zreprodukování experimentu s moderními metodami doposud nikdo nepokusil.

ANT z *N. Crassa* bylo opět rekonstituováno do membrán a podrobeno elektrofyziologickému měření. Získané výsledky korespondovaly s předchozími měřeními a byly podobné charakteristikám mPTP až na několik výjimek.

Konkrétní odlišnosti zahrnovaly:

I) Utvořený kanál z rekonstituovaného ANT nejevil žádné známky citlivosti k CsA. (Brustovetsky et al. 2002) Příčinou mohla být absence Cyp-D v experimentálním systému, je však možné, že se jedná o vlastnost ANT z *N. Crassa*, neboť již byla prokázána existence organismů, u kterých schopnost regulace mPTP pomocí CsA chybí (*S.Cerevisiae*) (Jung, Bradshaw, a Pfeiffer 1997).

II) Skupina nedetekovala stav PT u rekonstituovaných liposomů. Autory uvedená naměřená konduktance o výši až 700 pS, která je označována termíny: „připomínající“ či „podobná charakteru mPTP“ je ovšem poloviční konduktancí, než jaká byla naměřena v původních charakterizačních pracích (zde je konduktance PT uváděna jako 1,4 nS) (Brustovetsky et al. 2002).

III) Kanál byl nesenzitivní ke karboxyatraktylátu (CAT). CAT i ATR mají stejný účinek na ANT, hlavním rozdílem mezi nimi je, že CAT je nekompetitivním inhibitorem ANT. (Brustovetsky et al. 2002)

Mezi savčím ANT a ANT z *N. Crassa* je zachována velmi vysoká míra homologie, není ale vyloučeno, že existující rozdíly mohly ovlivnit výsledky. Autoři však argumentovali, že míra homologie je dostačující, aby naměřené údaje mohly poskytnout vhled do funkce ANT v

savčím systému (Brustovetsky et al. 2002). Na druhou stranu vysokou míru homologie nalezneme u všech proteinů rodiny SLC 25 a je všeobecně známo, že i malé rozdíly u nich mají velký vliv na jejich funkci (Palmieri 2004).

Pozorování, která izolátům ANT přisuzovala vlastnosti mPTP, byla prezentována i dalšími vědeckými skupinami. Byl zachycen Ca^{2+} indukovaný únik aniontů (kterými jsou například malát, ATP, AMP). ANT v tomto případě rovněž svými regulačními vlastnostmi připomínalo charakter mPTP (Rück et al. 1998).

Brustovetského objevy vedly k silné podpoře tvrzení, že ANT má hlavní roli ve fenoménu přechodné propustnosti, zastávající roli tzv. kanál tvořící komponenty mPTP. Fakt, že ANT je schopno samo o sobě vytvořit kanál s vlastnostmi připomínajícími MMC vedlo autory k závěru, že jednotkou nezbytnou k navození PT je právě ANT. Ostatní konstituenty proteinového komplexu, dříve považovány za nezbytné k otevření kanálu, mohou a s nejvyšší pravděpodobností hrají výhradně roli regulační (Brustovetsky et al. 2002).

3.1.1 Vliv Cyp-D a jeho regulátoru CsA na ANT utvářený kanál

Bylo popsáno, že přidání Cyp-D je nezbytné k navození citlivosti mPTP k CsA (Crompton et al. 1999), díky interakci zprostředkovanou vazbou Cyp-D na ANT (Crompton, Virji, a Ward 1998; Woodfield et al. 1998). Tento poznatek ovšem neposkytoval dostatečný vhled do strukturních problematik póru. Brustovetsky v další části svého bádání na rekonstituovaných liposomech *N. Crassa* provedl řadu experimentů s cílem objasnění vlivu Cyp-D na ANT.

Zjištění, že samotný vápník je schopen u ANT vyvolat otevření kanálu nesenzitivního k CsA bez přítomnosti proteinů komplexu naznačilo, že role Cyp-D bude rovněž rolí regulační (Rück et al. 1998; Brustovetsky et al. 2002). To vedlo autory k další sérii pokusů se snahou zjistit, jakým způsobem tento protein ovlivňuje schopnost ANT utvářet mPTP připomínající stavy a zdali má efekt na samotné utváření kanálu.

Překvapivým výsledkem na modelu ANT z *N. Crassa* bylo odhalení, že cyklofilin-N (Cyp-N, Varianta cyklofilinu nacházená u *N. Crassa*) dokázal svou přítomností ovlivnit aktivitu ANT kanálu bez přítomnosti jakýchkoliv jiných proteinů komplexu. Vazbou k ANT Cyp-N stabilizoval otevření kanálu, stabilizace byla doprovázena zvýšením měřené konduktance kanálu. Přidání CsA mělo za následek zrušení stabilizačního efektu způsobeného Cyp-N.

Přídavek Cyp-D a ADP, známého pro svůj inhibiční vliv na mPTP, k ANT vyvolalo díky přítomnosti Cyp-D „flickering kanálu“ místo jeho inhibice. Cyp-D tedy zprostředkovává

citlivost ANT utvářeného kanálu k CsA a jejich vazba dle autorů s nejvyšší pravděpodobností zesiluje stabilitu otevřeného kanálu i u savčích modelů (Brustovetsky et al. 2002). Je však třeba podotknout, že předchozí experimenty prostřednictvím afinitní chromatografie s CypD odhalily, že cyklofilin-D se váže se stejnou afinitou k savčím i ke kvasinkovým ANT (Woodfield et al. 1998), u kterých je známo, že regulace pomocí CsA zcela chybí (Jung, Bradshaw, a Pfeiffer 1997).

Mezi velmi slibné poznatky patří rovněž zjištění, že přítomnost oxidantů zvyšuje vazbu cyklofilinu-D k ANT, tato vlastnost může být důvodem zvýšené citlivosti mPTP během oxidačního stresu vlivem stabilizačního efektu způsobeného navázaným Cyp-D (Brustovetsky et al. 2002; Crompton, Virji, a Ward 1998; Woodfield et al. 1998).

3.2 Modely funkce ANT

3.2.1 Konformační změny ANT vlivem jeho regulátorů

V úvodu kapitoly 3. byly zmíněny dva všeobecně známé inhibitory ANT: ATR a BKA. Tyto inhibitory ovlivňují strukturní konformace ANT a těmito změnami i regulují otevírání ANT utvářeného kanálu.

Důležitým poznatkem je, že BKA i ATR inhibují primární funkci proteinu ANT. Každý z nich však stabilizuje ANT v různých strukturních konformacích. ATR stabilizuje ANT v takzvané konformaci c, kdy místo pro vazbu substrátu v této konformaci směřuje do cytoplasmy, zároveň se jedná o konformaci, které podporuje otevření mPTP. BKA naopak navozuje u ANT stabilizaci v konformaci m, kde místo pro vazbu substrátu směřuje do matrix a konformace m inhibuje otevírání mPTP (Schultheiss a Klingenberg 1984). Tyto strukturní poznatky vlivu modulátorů na membránový přenašeč postupně vedly ke vzniku protichůdných názorů a diskusi na jeho konkrétní roli v mPTP:

- a) Závislost regulace na konformačních stavech implikuje, že ANT je přímo komponentou mPTP (Halestrap a Brenner 2005).
- b) ANT ovlivňuje pomocí konformačních změn membránový potenciál.

Navazující práce na toto téma ukazují, že přechod mezi konformačními stavy c a m je doprovázen velkým poklesem membránového potenciálu, a tím připouští správnost druhého pohledu (Rottenberg a Marbach 1990a, 1990b).

Od prvního pohledu bylo upuštěno po prezentaci výsledků prevalence PT v modelech postrádajících ANT, VDAC či další konstituenty proteinového komplexu. podrobnější rozbor tvrzení proti ústřední roli ANT bude probrán v kapitole 3.3.

3.2.2 ANT a oxidační stres

Již prvotní chromatografické experimenty poukázaly na důležitost redoxního stavu thiolových zbytků k interakci a vazbě Cyp-D k ANT. Ošetření vzorků diamidem vedlo ke zvýšení četnosti navázaného Cyp-D k ANT v IMM vlivem vzniku disulfidových můstků. Tyto vzniklé crosslinky byly zrušeny přidáním CsA (Woodfield et al. 1998). V následujících experimentech bylo demonstrováno, že mutantní buňky bez Cyp-D nebyly schopny podstoupit PT vyvolané oxidačním stresem (Baines et al. 2005). Je tedy možné prohlásit, že cyklofilin-D hraje významnou roli v regulaci mPTP nejen díky své afinitě k inhibitoru CsA, ale rovněž díky zprostředkování odpovědi póru na oxidační stres. Přítomnost oxidantů rovněž snížila afinitu k ADP, dalšímu z inhibitorů. Oxidace thiolových zbytků ANT tedy předchází PT a apoptóze (Woodfield et al. 1998).

Byl navržen model, ve kterém izomerací prolinových zbytků dochází k vazbě Cyp-D na ANT prostřednictvím CsA vazebné domény. Vazba CsA poté zapříčiní rozpad komplexu a všechny s ním spojené vlivy na regulaci mPTP (Woodfield et al. 1998). Díky objevům vlivů oxidantů na modulaci mPTP vznikla i hypotéza, že vznik póru samotného je pouze následek ireverzibilních změn způsobených oxidačním poškozením způsobeným vlivem ROS či jinými oxidanty (He a Lemasters 2002). Tuto hypotézu podporuje i zjištění, že vlivem oxidačního stresu dojde ke vzniku spojení lysinu s fosfolipidy. Toto spojení by vysvětlovalo přirozenou vazbu ANT ke kardiolipinům, kterou lze v mitochondriích běžně detekovat (Schlame et al. 1991).

Vlivem oxidačního stresu nejprve dochází k oxidaci thiolových zbytků a posléze ke vzniku ireverzibilních změn – tvorbou lysinových aduktů s fosfolipidy na rozhraní ANT x kardiolipin. Lysiny se začnou sféricky odpuzovat, čímž dojde ke konformační změně v ANT a utvoření póru (Hoffmann et al. 1994; Brustovetsky a Klingenberg 1996).

3.3. ANT inaktivované modely

Kokoszka a spol. demonstrovali, že u myši s inaktivací ANT1/ANT2 genů stále dochází k indukci stavu PT spojeného s únikem cytochromu c do cytoplasmy (Kokoszka et al. 2004). Myši genom kóduje tři isoformy ANT: ANT1, ANT2 a ANT4, (které je přítomné pouze v testikulární tkáni) (Brenner et al. 2011).

Zajímavým zjištěním bylo, že pro indukci PT v ANT1/ANT2 inaktivovaných myších modelech bylo za potřeby dvojnásobné koncentrace Ca^{2+} iontů. Nepřekvapivě také mPTP ztratil senzitivitu k ANT inhibitorům. Mitochondrie těchto myších modelů rovněž vykazovaly vysokou intenzitu respirace, která je přisuzována vyššímu výskytu cytochromu c a komplexu I v tomto modelu (Kokoszka et al. 2004). Tato studie bohužel nebyla nikdy doplněna či rozšířena o elektrofyziologická měření, která by v tomto případě mohla poskytnout podstatné informace o změnách vodivosti na vnitřní mitochondriální membráně.

4. PiC jako hlavní konstituent mPTP

Fosfátový přenašeč (phosphate carrier protein, PiC) je protein vnitřní mitochondriální membrány spadající do proteinové rodiny SLC25, jehož hlavní úlohou je transport aniontů fosfátu (P_i) přes vnitřní mitochondriální membránu (Palmieri 2004).

4.1 Model funkce PiC ve fenoménu PT

V období zkoumání role ANT jakožto možného nezbytného strukturního konstituentu mPTP bylo odhaleno, že jedna z těchto protilátek určená primárně k imunoprecipitaci ANT, rozpoznala taktéž PiC. Následná koimunoprecipitace odhalila CsA senzitivní vazbu Cyp-D k PiC (Leung, Varanyuwatana, a Halestrap 2008).

Tato odhalení vedla autory k předložení modelu, ve kterém je mPTP formováno díky konformačním změnám PiC skrze vazbu Cyp-D. Není vyloučená možná interakce PiC s ANT, umožňující modulaci póru jejich ligandy (Leung a Halestrap 2008). Mezi zjištění podporující tento model patří rovněž fakt, že PiC při rekonstrukci do liposomů během patch clamp experimentů disponuje chováním připomínajícím mPTP (Herick, Krämer, a Lühring 1997). Tento model je taktéž podpořen studií, ve které byl prokázán vliv fosfátu na modulaci mPTP – jeho inhibici při nízké koncentraci P_i (Basso et al. 2008), dokonce i jeho aktivaci při vysokých koncentracích za přítomnosti Ca^{2+} (Kowaltowski et al. 1996). Byl předložen návrh, s možným vlivem PiC na PCD, bylo demonstrováno, že modely s umlčenou expresí PiC podstupují programovanou buněčnou smrt v menší míře (Alcalá et al. 2008).

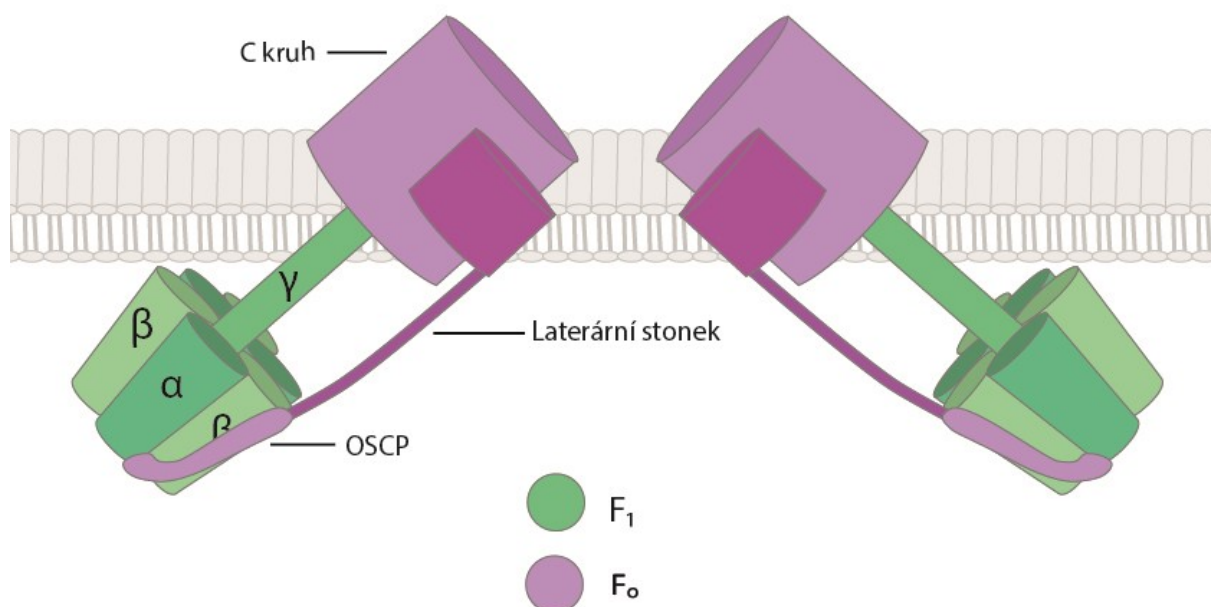
4.2 Experimenty v rozporu s PiC modelem

Halestrap a jeho skupina ovšem prokázali, že snížená exprese PiC nijak neovlivňuje maximální koncentraci vápenatých iontů nutných k indukci PT (Varanyuwatana a Halestrap 2012). Navazující experimenty spočívající v odstranění genů pro PiC neodhalily žádné změny v mPTP kanálu. Tato zjištění následně vyústila k upuštění možnosti PiC jako esenciálního kanál tvořící jednotky mPTP (Gutiérrez-Aguilar et al. 2014). Tento konsenzus ovšem nevylučuje možnou

modulační roli, kterou PiC může hrát díky kontrole póru prostřednictvím změn hladin fosfátu v matrix mitochondrie (Kwong et al. 2014).

5. ATP syntáza.

ATP syntáza, rovněž označována jako komplex V oxidačně fosforylačního aparátu, je enzym vnitřní mitochondriální membrány. Skládá se z mnoha proteinových podjednotek a funkčně je dělitelná na dvě části. Membránovou část F_o a část F_1 , jež ční do mitochondriální matrix. Enzym využívá proton motivní síly vytvořené komplexy dýchacího řetězce během finální oxidace substrátu, k syntéze ATP z ADP a P_i . Využití $\Delta\psi$ vede k roztočení kruhu podjednotek c a následným konformačním změnám v katalytické F_1 části (Walker 2013).



Obrázek 3: Zjednodušený model dimeru ATP syntázy. Malováno na podkladu ilustrace Massima Bonory (Bonora et al. 2015).

5.1 ATP syntáza jako channel forming unit mPTP

Ve snaze objasnit dlouhodobou otázku struktury mPTP byl Cyp-D podroben dalšímu zkoumání. Experimenty za pomoci modré nativní elektroforézy odhalily vazbu Cyp-D k ATP syntáze (Giorgio et al. 2009), konkrétně pak její podjednotce OSCP (Giorgio et al. 2013). Vazba Cyp-D byla modulována přítomností P_i a CsA (Giorgio et al. 2009). Rovněž byla odhalena vazba benzodiazepinu-423 (Bz-423), o kterém se původně předpokládalo, že se váže na

benzodiazepinový receptor TSPO přítomný v OMM. Bz-423 soupeří společně s Cyp-D o stejné vazebné místo na OSCP. Vazba Bz-423 se projevuje snížením aktivity ATP syntázy o 30 % a zvýšení pravděpodobnosti otevření mPTP (Leung a Halestrap 2008; Giorgio et al. 2013).

Na základě prvotních studií se ATP syntáza stala novým kandidátem pro studium jeho možné role jako kanál formující jednotky mPTP. Zanedlouho byly představeny dva modely.

5.1.1 kanál mPTP je tvořen dimery ATP syntázy.

První hypotézu předložila Valentina Giorgio. Demonstrovala, že purifikované dimery ATP syntázy, které byly rekonstituovány do fosfolipidových, membránových dvojvrstev, disponují kanálovou aktivitou, která byla potvrzena pomocí elektrofyziologických experimentů. Byla zachycena vodivost až $1,3 \text{ nS}$ a mnoho různých vodivostních mezistavů (Giorgio et al. 2013).

Důležitým poznatkem z této studie je, že výše zmíněná konduktivita byla zachycena pouze u dimerů ATP syntáz, nikoliv jejich monomerů. Kanálová aktivita dimerů byla navozena přidávkou Ca^{2+} , Bz-423 a inhibována Mg^{2+} a ADP. Inhibice pomocí CsA nebyla navozena z důvodu absence Cyp-D v experimentálním systému. Rovněž nebylo překvapující, že rekonstituovaný systém neodpovídal na přidávky běžných inhibitorů ANT (Giorgio et al. 2013).

Podle výsledků těchto experimentů došli autoři k závěru, že dimery ATP syntázy jsou dalším slibným kandidátem hlavní strukturní komponenty mPTP. Na buněčné membráně se ATP syntáza běžně vyskytuje v dimerech a vyšších oligomerech (Giorgio et al. 2013). Díky tomuto uskupení dokáže ohýbat vnitřní mitochondriální membránu, čímž přispívá k tvorbě mitochondriálních krist (Davies et al. 2012). Množství dimerů tedy může být dostačující, aby mohly skutečně tvořit mPTP. Výskyt dimerů ATP syntáz na vnitřní mitochondriální membráně byl rovněž zaznamenán i u jiných experimentálních modelů, mezi které patří *Drosophila melanogaster* i *Sacharomyces cerevisiae* (Carraro et al. 2014; Von Stockum et al. 2015). Velmi zajímavý poznatek však přináší elektrofyziologické měření na modelu octomilky, jejíž ATP syntázy v dimerické formě dosahují vodivostních veličin o pouhé velikosti 50 pS (Von Stockum et al. 2015). Zároveň je *D. Melanogaster* považována za model, u kterého nedochází k procesu bobtnání mitochondrií (Von Stockum et al. 2011). Proti této studii byla vznesena námitka, že eluované proteiny mohly podlehnout degradaci, a tudíž by konformační změny ovlivnily výsledek elektrofyziologického měření. Autoři jsou však přesvědčeni o tom, že purifikovaný enzym byl intaktní, neboť užití stejné metody již dříve vyústilo v izolaci plně funkčního proteinu při předchozích pracích na proteinu Tim22 (Rehling et al. 2003), nicméně definitivní test funkčnosti ATP syntázy chybí.

5.1.2 kanál mPTP je tvořen kruhem podjednotek c ATP syntázy.

Druhá hypotéza uvažuje o možnosti tvorby mPTP kanálu přímo v c kruhu ATP syntázy pomocí konformačních změn podjednotek gamma, delta a epsilon F_1 části ATP syntázy, které následně ovlivňují c kruh membránové části enzymu (Alavian et al. 2014).

Tato hypotéza je dále podporována pomocí modelu ρ^0 buněk, ve kterém mitochondriím zcela chybí jejich mtDNA (King a Attardi 1989). Tímto počinem jsou eliminovány mitochondriálně kódované podjednotky a a A6L. Proces PT byl stále pozorovatelný (Masgras, Rasola, a Bernardi 2012), jediná zbylá hydrofobní podjednotka schopná konduktivity je v tomto modelu podjednotka c (McGeoch a Guidotti 1997), či shluk malých F_o podjednotek.

Při snížení exprese podjednotky c pomocí siRNA došlo ke snížení aktivity PTP v experimentálním systému. Naopak navýšení exprese podjednotky c zapříčinila vyšší aktivitu PTP. Velmi zajímavé je pak zjištění, že deplece podjednotky c v měřeném systému měla za následek stejně silnou inhibici, jakou měla CsA. Autoři na základě těchto pozorování došli k závěru, že podjednotka c je ke správné funkci mPTP nezbytná (Bonora et al. 2013).

Následná purifikace c podjednotky ATP syntázy a její inkorporace do membrány po podrobení elektrofyziologickým experimentům odhalila, že podjednotky c po rekonstituci do membrán utvářejí napěťově senzitivní kanál, který je schopen indukovat rychlou depolarizaci membrán. Přidání Ca^{2+} mělo za následek zvětšení c kruhem utvářeného kanálu a vytvářející možný mechanismus otevírání mPTP také díky vyvazování komplexu CsA/Cyp-D z vazebných míst na podjednotce c (Alavian et al. 2014).

Velmi zajímavé bylo však pozorování, při kterém po přidavku exogenní podjednotky beta F_1 části ATP syntázy došlo k drastickému zvýšení pravděpodobnosti uzavření tohoto póru. Je tudíž diskutována možná role F_1 ATP syntázy v regulaci mPTP (Alavian et al. 2014).

5.2 Výzkum Vlivu ATP syntázy na pór přechodné propustnosti.

V důsledku velkých názorových rozdílů na strukturní komponenty ATP syntázy, které by měly pór formovat, využívaly různé skupiny genetických manipulací komplexu V ve snaze získat poznatky, které by pomohly potvrdit definitivní roli tohoto enzymu jako hlavní strukturní jednotky mPTP či ukázat správnost jednoho ze dvou pohledů.

5.2.1 Bodové mutace podjednotky beta

Bodové mutace podjednotky beta vedly ke snížené ATPázové aktivitě a ke snížené citlivosti mPTP k vápníku (Giorgio et al. 2017). tyto poznatky jsou tedy v souladu s předchozími pracemi skupiny Alavian (Alavian et al. 2014).

5.2.2 Podjednotky g a e

ATP syntáza rovněž s nejvyšší pravděpodobností zprostředkovává odpověď k fenylglyoxalátu (PGO) Prostřednictvím své podjednotky g. Tato podjednotka se chová jako vazebné místo pro PGO díky Arg zbytkům ve vazebném místě (Takahashi 1968). Bodová mutace R107A pak zapříčinila absenci bobtnání za přítomnosti PGO (Guo et al. 2018).

Další bádání, které se snažilo objasnit roli dimerů komplexu V ve fenoménu PT, spočívalo v eliminaci exprese podjednotek g a e. Tyto podjednotky jsou nezbytné k utváření dimerických a vyšších oligomerických struktur (Hahn et al. 2016). Tímto zásahem do struktury došlo ke značnému snížení citlivosti mPTP k Ca^{2+} (Carraro et al. 2014). Tento model byl následně podroben vynucené oligomerizaci prostřednictvím přidání kovových iontů. Elektrofyzilogické experimenty odhalily oproti WT buňkám až 10x nižší vodivost i přes skutečnost, že byl zaznamenán vápníkem indukovaný únik aniontů. Co zaznamenáno nebylo, bylo však mitochondriální bobtnání. Autoři toto pozorování komentují s tím, že díky nucené oligomerizaci dochází ke zmenšení dimerem utvářeného kanálu, který má stále vodivostní vlastnosti, nicméně jeho velikost neumožňuje efektivně podstoupit PT spojené s procesem bobtnání (Carraro et al. 2018).

Velká důležitost interakce podjednotek g a e pomocí svých aminokyselinových zbytků byla prokázána pomocí bodových mutací. V mutantních modelech bylo zjištěno, že tyto aminokyseliny se pomocí svých zbytků podílí na stabilitě dimerů komplexu V a zvýšením jeho celkové vodivosti (Guo et al. 2019).

5.2.3 Histidinové zbytky matrix strany

Mezi neméně zajímavá zjištění rovněž patří to, že proces PT je regulován pomocí histidinových zbytků na matrix straně mitochondrie (Nicolli, Petronilli, a Bernardi 1993). Protonací zbytků při nízkém pH dochází k inhibici PTP. Podjednotka OSCP laterálního stonku ATP syntázy disponuje místem H112, jehož funkce spočívá v inhibici mPTP při nízkém pH. Záměna H112 Q/Y způsobila ztrátu inhibičního mechanismu prostřednictvím pH (Antoniell et al. 2018).

5.3 Studie proti F-ATP syntázovému modelu

Vědecká skupina Sira Johna Walkera však předložila významné argumenty a poznatky, které jsou v rozporu s hypotézami, které přiřazují hlavní roli ve funkci mPTP právě ATP syntáze.

Na pozadí haploidního modelu HAP1 buněk byla vytvořena řada KO modelů pro podjednotky ATP syntázy. Tyto modely byly následně využity pro studium mPTP.

První studie představila KO model, u kterého jsou inaktivovány všechny tři isoformy podjednotky c, jenž byl podroben měření koncentrace vápníku po jeho permeabilizaci (He, Ford, et al. 2017). Ve druhé studii bylo naopak zabráněno tvorbě dimerů ATP syntázy pomocí odstranění podjednotek b a OSCP laterálního stonku a následně byla opět měřena koncentrace vápníků v permeabilizovaných buňkách za pomoci fluorescenční sondy (He, Carroll, et al. 2017).

V obou případech byla zaznamenána přítomnost fenoménu PT. Skupina v první studii na základě předchozích experimentů s ρ^0 buňkami (Masgras, Rasola, a Bernardi 2012) tedy dovozuje, že žádná z membránových podjednotek F_0 ATP syntázy nemůže tvořit hlavní strukturní komponentu mPTP. Rovněž že pak podjednotka OSCP laterálního stonku není cílem pro regulaci PT pomocí Cyp-D (He, Carroll, et al. 2017).

Konečně ve třetí, navazující studii pak demonstrovali přítomnost fenoménu PT v buňkách, ve kterých ATP syntáza chybí (Carroll et al. 2019).

Zastánci hypotéz zahrnující ATP syntázu jako hlavní kanál formující jednotku PTP argumentují příliš velkými sekundárními změnami v respiraci způsobenými genetickou manipulací. Rozporují především skutečnost, že narušení přirozené respirace negativně ovlivňuje výsledky díky změnám v příjmu vápníku, který je mitochondriemi přijímán s využitím H^+ gradientu (Bragadin, Pozzan, a Azzone 1979). Respiraci utvářený membránový potenciál je tudíž klíčový ke správnému fungování mPTP. důležitou poznámkou pak je, že během vstřebávání vápníku je mitochondriální respirace stimulována až na maximální možnou úroveň (Nicholls 1978). Tyto respirační defekty jsou rovněž zapříčiněny sekundárně sníženým množstvím ostatních komponent elektron transportního řetězce vnitřní mitochondriální membrány. Zejména celková absence komplexu V vyústila v dramatický pokles ostatních proteinů. Nejvíce zasaženým komplexem byl pak komplex I, u něhož dokonce nebyla detekována jeho maturovaná forma (He, Carroll, et al. 2017). Poslední argument, který zastánci hypotézy ATP syntázy přednesli, bylo poukázání na fakt, že bobtnání mitochondrií probíhalo u mutantních buněk v menší míře, a to o 20-40 % (He, Carroll, et al. 2017).

Tyto skutečnosti se dají poté vysvětlit dvěma způsoby:

- 1) Vlivem mutace došlo ke zmenšení póru
- 2) V mutantních buňkách neexistuje mPTP, je však přítomen jiný kanál senzitivní k CsA (Carraro et al. 2019)

5.4 Současnost mPTP

I přes skutečnost, že jednotlivé vědecké týmy prezentují výsledky, které jsou ve vzájemném rozporu, jsou i v současné době publikovány nové studie rozpracovávající jednotlivé hypotézy.

Massimo Bonora ve své nové studii ukazuje, že během otevření mPTP dochází k disociaci dimerů ATP syntázy. Stabilizace ATP syntázy v dimerech má pak za následek celkovou inhibici otevření mPTP (Bonora et al. 2017). Další důležitá studie v hypotéze c kruhu poté odhalila, že monomerní forma ATP syntázy byla dostačující k indukci vápníkem aktivované kanálové aktivity připomínající proporce mPTP (Mnatsakanyan et al. 2019). O velmi slibné výsledky pro definitivní určení role c kruhu ve fenoménu přechodné propustnosti se zasloužila Maria Neginskaya, jež podrobila patch clamp experimentům haploidní buňky s narušenou expresí podjednotky c, použité laboratoří Johna Walkera. Buňky bez podjednotky c ATP syntázy se vyznačovaly velmi nízkou vodivostí v rozmezí 300 pS, zatímco kontrolní buňky disponovaly vodivostí pro MMC běžnou pohybující se v rozmezí 1,5 nS. Zbylá konduktance 300 pS vyskytující se v buněčném knockoutu je přisuzována vodivosti ANT, neboť měřený kanál reagoval na BKA, již zmíněný inhibitor ANT. Z tohoto pozorování skupina usuzuje, že podjednotka c je nezbytná ke správnému fungování mPTP, neboť bez ní je přítomen pouze kanál o nízké vodivosti, reagující rovněž na CsA a inhibitory ANT (Neginskaya et al. 2019).

Paolo Bernardi se svojí skupinou však v rozporu s hypotézami c kruhu v nedávné době publikoval studii, v níž byly rekonstituovány plně funkční ATP syntázy do liposómů. Kanálovou aktivitou však disponovaly pouze dimery a vyšší oligomery (Urbani et al. 2019).

Velmi zajímavý je zde i dříve zmíněný model úplné absence ATP syntázy, ve kterém je demonstrována persistence fenoménu PT v buňkách zbavených sestavené ATP syntázy. Zvolená metoda spočívala v měření koncentrace vápníku v permeabilizovaných buňkách pomocí fluorescenční sondy (Carroll et al. 2019). Pro přesnější porozumění by však bylo vhodné zopakovat elektrofyziologické patch clamp experimenty na mitoplastech (Neginskaya et al. 2019). Možným vysvětlením je, že perzistentní kanál o nízké vodivosti, který byl

v předchozích experimentech zaznamenán je rovněž schopen podstoupit únik Ca^{2+} v měřeném systému.

6. Fyziologický význam mPTP

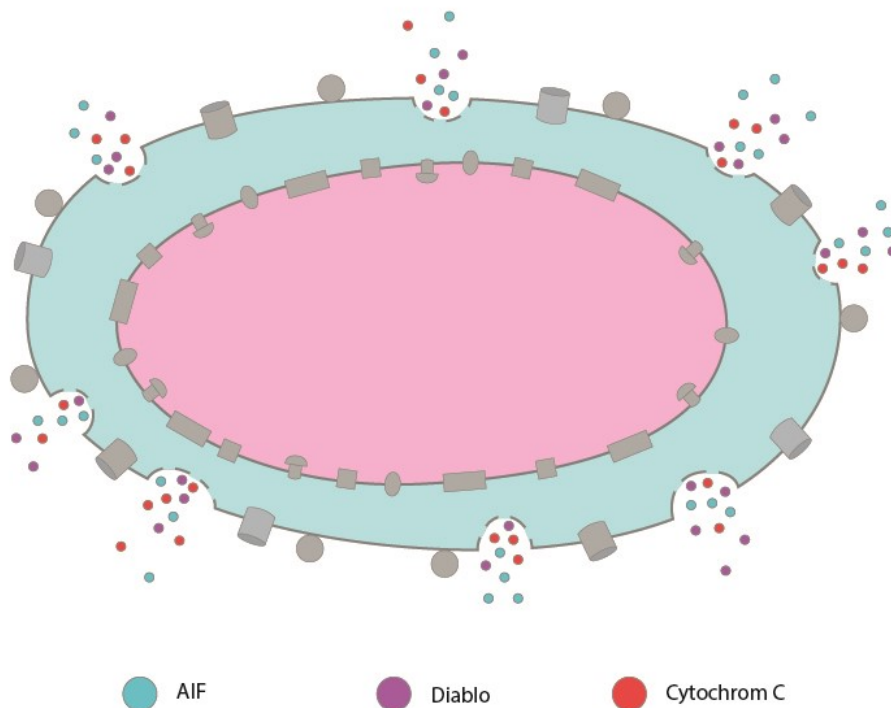
6.1 Permeabilizace vnější mitochondriální membrány

Permeabilizace vnější mitochondriální membrány (MOMP) hraje centrální roli v regulaci PCD. MOMP je často označován jako nevratný děj po jehož průběhu dojde v buňce k apoptóze, regulované nekróze či dalším druhům PCD (Tait a Green 2013).

nezávisle na indukujících mechanismech dochází ke zkratování transmembránového potenciálu mitochondrie (Waterhouse et al. 2001), zastavuje se syntéza ATP a procesy, k jejichž správnému fungování je výše zmíněného transmembránového potenciálu zapotřebí, mezi tyto procesy patří zejména pak transport proteinů a potřebných molekul do mitochondrie (Ricci et al. 2004). Samotný proces MOMP je zakončen vyplavením mnoha druhů cytotoxických proteinů do cytoplasmy (Kroemer, Galluzzi, a Brenner 2007). Mezi tyto cytotoxické proteiny patří cytochrom c, AIF a diablo, najdeme jich však více (Muñoz-Pinedo et al. 2006).

Proces MOMP je navozován dvěma mechanismy. První z nich se odehrává na OMM pomocí proapoptotických proteinů rodiny BCL-2, BAX a BAK (Wei et al. 2001). Stav MOMP lze taktéž vyvolat na IMM pomocí mPTP (Brenner a Grimm 2006). Díky náhlému zvýšení membránové propustnosti dojde k narušení elektrochemických gradientů pro soluty o nízké molekulové hmotnosti. Následně pak vlivem osmotických sil dojde ke vniku vody do matrix mitochondrie, což má za následek mitochondriální bobtnání IMM vedoucí až k prasknutí OMM, a tudíž i k MOMP (Brenner a Grimm 2006; Kroemer, Galluzzi, a Brenner 2007).

MOMP díky svému ústřednímu významu v regulaci programované buněčné smrti hraje významnou roli v patofyziologii ve velmi širokém spektru onemocnění. mPTP jako jeden z mechanismů navození MOMP je tudíž slibným předmětem zkoumání, jelikož pór samotný by mohl být při jeho lepším strukturním poznání využit k cílení léčiv.



Obrázek 4: V důsledku otevření mPTP dochází k vniku vody do IMM, jejímu nabobtnání a narovnění. Tento proces způsobí prasknutí OMM a následné vyplavení proapoptotických proteinů z IMS do cytoplasmy.

6.2 Navození PCD

Pokud nastane v buňce převaha mitochondrií s mPTP navozenou MOMP nad mitochondriemi ve fyziologickém stavu, dojde k navození programované buněčné smrti. Malé množství poškozených mitochondrií s otevřeným mPTP může být buňkou odstraňováno za pomoci autofagických procesů, čímž dochází k regulaci jejich počtu a navýšení odolnosti buňky k apoptotickým procesům (Green, Galluzzi, a Kroemer 2011). Pokud však dojde k rychlé indukcii mPTP v globálním měřítku, nastane buď apoptóza či regulovaná nekróza. Který z procesů nastane, závisí zejména na množství ATP v buňce, neboť k navození apoptózy je zapotřebí ATP k aktivaci kaspáz (Leist et al. 1997).

6.3 Regulace mPTP a jeho konduktanční stavy.

Ve fyziologických podmínkách jsou rozeznávány dva vodivostní stavy mPTP: stav nízké, přechodné vodivosti a stav vysoké konduktance (Crompton a Costi 1990; Zoratti a Szabò 1995). Pokud v mitochondriích převládá po delší dobu stav vysoké vodivosti, nastává PCD (Rasola a Bernardi 2007). Stav nízké konduktivity hraje roli v homeostázi vápníku mitochondrie (Ichas, Jouaville, a Mazat 1997). Přechod do stavu vysoké konduktivity je stimulován již výše zmíněnými aktivátory mPTP.

6.3.1 Regulace mPTP pomocí Ca^{2+} buňčinné signalizace

Ca^{2+} patří mezi důležité druhé posly, jejichž úkolem je správná funkce buněčné signalizace (Pinton et al. 2008). Během procesu signální transdukce, kdy dochází k uvolnění vápníku z endoplasmatického retikula do cytoplasmy, přijímají blízké mitochondrie část vápenatých iontů (Biden, Wollheim, a Schlegel 1986), během tohoto příjmu dochází ke stimulaci mitochondriální respirace (Nicholls 1978). Zabavením části vypuštěných iontů dochází k modulaci intenzity vápníkového signálu v cytoplasmě.

Zajímavé je, že mPTP, operující ve stavu nízké konduktivity, je schopno umožnit vyplavení dříve akumulovaných vápenatých iontů v krátkých dávkách, při kterých dochází k částečné depolarizaci protonového gradientu. Tento proces je označován jako mCICR (mitochondrial calcium induced calcium release) (Ichas, Jouaville, a Mazat 1997). V *In vitro* podmínkách dokonce pomocí mCICR dochází k přenosu signálu mezi jednotlivými mitochondriemi. Dochází tak ke vzniku depolarizačních vln napříč zkoumanou soustavou. V podmínkách *In vivo* pomocí mCICR dochází k amplifikaci Ca^{2+} signálu vyvolaného vyplavením proudu Ca^{2+} iontů z endoplasmatického retikula (Ichas, Jouaville, a Mazat 1997).

6.3.2 Regulace mPTP pomocí OXPHOS

Fascinující roli v ovlivnění citlivosti mPTP k vápníku hrají i proteiny oxidační fosforylace, zejména pak komplex I. Pokud komplexem I prochází elektrony, citlivost mPTP k vápníku se značně zvyšuje (Fontaine et al. 1998). Rovněž byla zaznamenána inhibice mPTP po ošetření vzorků rotenonem, všeobecně známým inhibítozem komplexu I (Li et al. 2012).

Společně s regulací pomocí vápníku utváří OXPHOS komplexní regulační systém. Během příjmu vápníku dochází k výše zmíněné stimulaci mitochondriální respirace a vyšší tvorbě ROS. (Starkov 2008; Li et al. 2012) Dochází-li tedy v mitochondrii k příjmu vápníku, mPTP je k němu v této fázi citlivější vlivem stimulace pomocí OXPHOS a tvorbou ROS.

6.4 Role v patofyziologii.

Již v rané fázi výzkumu mPTP bylo navrženo, že mPTP může díky své funkci v PCD hrát důležitou roli v patofyziologii různých druhů onemocnění. V současnosti bylo o roli mPTP v patofyziologii publikováno již přes 8 000 článků. V této práci budou stručně popsány hlavní druhy onemocnění, u nichž mPTP hraje důležitou roli.

6.4.1 účast mPTP na ischemickém/reoxidačním poškození.

Reoxidační poškození je patofyziologický stav, projevující se nevratným poškozením tkání náhlým obnovením příjmu kyslíku v tkáni po krátkém období hypoxie či anoxie vyskytující se zejména při infarktu myokardu či mozkové mrtvici.

Otevření mPTP překvapivě nastává až ve fázi reoxidace, neboť v období anoxie dochází rovněž k acidifikaci mitochondriální matrix a nízká hodnota pH pak působí inhibičně na mPTP. K hlavnímu poškození tudíž dochází až ve fázi reoxidace, kdy dochází k částečnému obnovení mitochondriální funkce, projevující se vysokou mírou produkce ROS a návratem pH do normálních hodnot (Griffiths a Halestrap 1995). Právě zvýšením hodnoty pH dochází k odstranění hlavního inhibičního prvku, jenž vyústí v otevření mPTP a ireversibilnímu poškození tkáně způsobené indukci PCD (Halestrap 1991).

mPTP se zdá být efektivním cílem pro zadržení reoxidačního poškození po infarktu myokardu či mozkové mrtvici. Studie zabývající se touto problematikou vskutku prokazuje, že u kardiomyocytů ošetřených CsA docházelo k ireversibilnímu poškození v prokazatelně menší míře než u kontrol (Duchen et al. 1993). Velmi slibné výsledky jsou prezentovány i v myších modelech u kterých chybí Cyp-D, v nichž byla prokázána menší náchylnost k ischemickému/reoxidačnímu poškození (Baines et al. 2005; Nakagawa et al. 2005).

6.4.2 účast mPTP na neurodegenerativních chorobách a svalové dystrofii

Účast mPTP na neurodegenerativních poruchách byla prokázána na mnoha zvířecích modelech neuronálního poškození. Mezi tyto neurodegenerativní onemocnění patří Amyotrofická laterální skleróza (als) (Keep et al. 2001) a Alzheimerova choroba (Du a Yan 2010). Velmi zajímavým výsledkem pak bylo prodloužení doby života u myších modelů als díky podávání CsA (Keep et al. 2001).

Ve studii vědecké skupiny Maile R. Browna bylo prokázáno, že mitochondrie synaptických neuronů oproti neuronům nesynaptickým zvládnou uložit pouze výrazně nižší množství vápníku před tím, než podstoupí PCD. V kombinaci s akumulací poškození mitochondrie vlivem stárnutí se pak synaptické mitochondrie stávají náchylné k otevření mPTP (Brown, Sullivan, a Geddes 2006).

Účast mPTP je rovněž prominentní i u svalových dystrofií způsobenými patologickými stavy v důsledku deficiencie kolagenu VI (Irwin et al. 2003), i dystrofií způsobenou stárnutím (Gouspillou et al. 2014). Nemoci odvozené od deficiencie kolagenu jsou Bethlem-myopatie,

jenž je autosomálně dominantní (Jobsis et al. 1996) a Ullrichova kongenitální svalová dystrofie, která je autosomálně recesivní (Vanegas et al. 2001).

Jedná se o svalové dystrofie způsobené deficiencí kolagenu VI v důsledku mutace genu pro jeho tvorbu. Tyto dystrofie se projevují ztrátou kontraktilní síly svalů a změnám v morfologii sarkoplasmatického retikula a mitochondrie, takto postižené svaly pak postupují spontánní apoptózy (Bonaldo et al. 1998). Podání cyklosporinu A pomohlo obnovit normální strukturu mitochondrií a výrazně se projevilo na snížení svalů podstupujících PCD *in vivo* (Irwin et al. 2003; Merlini et al. 2008).

Ve studii, v níž byla porovnávána náchylnost mitochondrií kosterních svalů starých a mladých fyzicky aktivních mužů byla jasně prokázána vyšší citlivost mPTP k vápníku, a to až o 50 %. Tato navýšení citlivosti mPTP mohou vysvětlovat ochabnutí svalů a pokles svalové hmoty vlivem stárnutí (Gouspillou et al. 2014).

6.4.3 účast mPTP na poškození jater

Ochranný vliv CsA na jaterní buňky byl testován na široké škále zvířecích subjektů, u nichž byly různými hepatotoxiny vytvářeny modely nemocí (Teckman et al. 2004; Feldmann et al. 2000; Pastorino et al. 1999). Rané studie na těchto modelech se rovněž zaměřovaly na optimální dávkování a *in vivo* efektivitu CsA na inhibici mPTP. V krysích modelech je nejlepší inhibice mPTP dosaženo v rozmezí 2-9 hodin po aplikaci CsA. Přidání CsA ochránilo zvířata před jinak letálními dávkami hepatotoxinů a cytotoxických molekul (Soriano, Nicolosi, a Bernardi 2004). Léčba pomocí CsA u hepatitidy B byla experimentálně otestována na lidech v roce 1995 v Japonsku, jako možnou alternativu k transplantaci. Ze 13 pacientů v kómatu se pomocí léčby cyklosporinem A podařilo uzdravit 8 (Yoshida et al. 1995).

6.4.4 účast mPTP na nádorovém bujení

Adaptace nádorových buněk spočívají v jejich odolnosti k otevření mPTP díky znecitlivění k ROS a Ca^{2+} . Je to právě schopnost odolat indukci PCD, jež hraje zásadní roli v tumorigenezi (Hanahan a Weinberg 2011).

Nádorové buňky podstupují celou řadu změn včetně změn metabolických pochodů, jejichž přičiněním u nich zejména dochází k řádově vyšší produkci ROS (Grek a Tew 2010). Nádorové buňky se této hladině brání vyšší tvorbou antioxidantů, aby nedošlo k indukci PCD vlivem otevření mPTP. Vysoká míra odolnosti proti ROS je pro tvorbu nádoru vznikajícího z neoplastu nezbytná (Denicola et al. 2011). Vyšší hladiny ROS naopak u rozvinutých nádorů mohou způsobovat vyšší malignitu, neboť zde dochází ke snížení genetické stability buněk, další

akumulaci mutací a také ke zvýšení invazivity. Rovněž metabolické adaptace nádorů, u kterých je ATP tvořena hlavně za pomoci anaerobní glykolýzy pomáhá k ochraně před tvorbou vyšší hladiny ROS (Trachootham, Alexandre, a Huang 2009).

Jedna z možných cest léčby nádorů může spočívat ve stimulaci produkce ROS. Tento přístup se zdá být elegantním řešením spočívajícím v překonání navýšené hladiny antioxidantů a následnému otevření mPTP cíleně u nádorových buněk, zatímco u zdravých buněk ještě nedojde k překonání hladiny ROS nutné k indukci PCD (Trachootham, Alexandre, a Huang 2009). Toto řešení s sebou však přináší mnohá úskalí. Výše již byla diskutována role mPTP ve svalových dystrofiích a neurodegenerativních onemocněních. Nelze vyloučit vedlejší účinky této léčby spočívající ve vyšší míře apoptóz nervových buněk a buněk svalových.

Používání cyklosporinu A jako imunosupresiva po transplantacích rovněž prospívá tvorbě nádorů, neboť inhibuje mPTP a ranné neoplastické buňky nemohou podstoupit PCD (André, Roquelaure, a Conrath 2004).

Závěr

Za léta bádání je již existence mPTP nesporná. Přesná znalost struktury však našemu poznání stále uniká. Genetické knockout experimenty na původně slibných kandidátech přinesly více otázek než odpovědí, neboť výsledky těchto studií byly v rozporu s dosavadními modely. Do budoucnosti se jako zajímavý jeví model, při kterém dochází k vzájemné interakci ANT a ATP syntázy. Při absenci jednoho z proteinů je stále detekován fenomén PT díky přetrvávajícímu výskytu proteinu druhého. Tento model by vysvětloval persistenci fenoménu PT v knockoutovaných modelelech ANT i ATP syntázy a o jeho podporu se zejména zasloužila Maria Neginskaya (Neginskaya et al. 2019). Mezi zjištění podporující tento model taktéž patří již potvrzená interakce mezi ANT i ATP syntázou v tzv. syntasomech (Nůsková et al. 2015).

I přes nejistoty ohledně strukturní podstaty mPTP je již jeho role v patofyziologii nevyvratitelná. V současnosti se jako léčivé metody využívá citlivosti póru k CsA. Snahou do budoucna je objevení lepších inhibitorů mPTP, jež by bylo možné využít místo CsA k cílené inhibici póru a léčbě patofyziologických stavů (Antonucci et al. 2020).

Seznam použité literatury

- Alavian, Kambiz N., Gisela Beutner, Emma Lazrove, Silvio Sacchetti, Han A. Park, Pawel Licznarski, Hongmei Li, et al. 2014. „An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1F₀ ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (29): 10580–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401591111>.
- Alcalá, S., M. Klee, J. Fernández, A. Fleischer, a F. X. Pimentel-Muiños. 2008. „A high-throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome c release". *Oncogene* 27 (1): 44–54. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210600>.
- André, N., B. Roquelaure, a J. Conrath. 2004. „Molecular effects of cyclosporine and oncogenesis: A new model". *Medical Hypotheses* 63 (4): 647–52. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.03.030>.
- Antonieli, Manuela, Kristen Jones, Salvatore Antonucci, Barbara Spolaore, Federico Fogolari, Valeria Petronilli, Valentina Giorgio, et al. 2018. „The unique histidine in OSCP subunit of F-ATP synthase mediates inhibition of the permeability transition pore by acidic pH". *EMBO reports* 19 (2): 257–68. <https://doi.org/10.15252/embr.201744705>.
- Antonucci, Salvatore, Moises Di Sante, Justina Sileikyte, Jordan Deveraux, Tyler Bauer, Michael J. Broun, Roberta Menabò, et al. 2020. „A novel class of cardioprotective small-molecule PTP inhibitors". *Pharmacological Research* 151 (leden). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104548>.
- Azzone, G. F., a A. Azzi. 1965. „Volume changes in liver mitochondria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Roč. 53. <https://doi.org/10.1073/pnas.53.5.1084>.
- Baines, Christopher P., Robert A. Kaiser, Nicole H. Purcell, N. Scott Blair, Hanna Osinska, Michael A. Hambleton, Eric W. Brunskill, et al. 2005. „Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death". *Nature* 434 (7033): 658–62. <https://doi.org/10.1038/nature03434>.
- Baines, Christopher P., Robert A. Kaiser, Tatiana Sheiko, William J. Craigen, a Jeffery D. Molkentin. 2007. „Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death". *Nature Cell Biology* 9 (5): 550–55. <https://doi.org/10.1038/ncb1575>.
- Basso, Emy, Valeria Petronilli, Michael A. Forte, a Paolo Bernardi. 2008. „Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation". *Journal of Biological Chemistry* 283 (39): 26307–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800132200>.
- Bereiter-Hahn, J., a M. Vöth. 1994. „Dynamics of mitochondria in living cells: Shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria". *Microscopy Research and Technique* 27 (3): 198–219. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070270303>.
- Bernardi, P. 1992. „Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization". *Journal of Biological Chemistry*. Roč. 267.
- Beutner, Gisela, Alexander Rück, Birgit Riede, Wolfram Welte, a Dieter Brdiczka. 1996. „Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore". *FEBS Letters* 396 (2–3): 189–95. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)01092-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)01092-7).
- Biden, Trevor J, Claes B Wollheim, a Werner Schlegel. 1986. „Inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular Ca²⁺ homeostasis in clonal pituitary cells (GH3). Translocation of Ca²⁺ into mitochondria from a functionally discrete portion of the nonmitochondrial store". *Journal of Biological Chemistry* 261 (16): 7223–29.
- Blachly-Dyson, Elizabeth, a Michael Forte. 2001. „VDAC channels". *IUBMB Life*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15216540152845902>.
- Bonaldo, Paolo, Paola Braghetta, Miriam Zanetti, Stefano Piccolo, Dino Volpin, a Giorgio M Bressan. 1998. „Collagen VI deficiency induces early onset myopathy in the mouse: An animal model for Bethlem myopathy". *Human Molecular Genetics* 7 (13): 2135–40. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.13.2135>.
- Bono, F., I. Lamarche, V. Prabonnaud, G. Le Fur, a J. M. Herbert. 1999. „Peripheral benzodiazepine receptor

- agonists exhibit potent antiapoptotic activities". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265 (2): 457–61. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1683>.
- Bonora, Massimo, Angela Bononi, Elena De Marchi, Carlotta Giorgi, Magdalena Lebiedzinska, Saverio Marchi, Simone Patergnani, et al. 2013. „Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition". *Cell Cycle* 12 (4): 674–83. <https://doi.org/10.4161/cc.23599>.
- Bonora, Massimo, Claudia Morganti, Giampaolo Morciano, Gaia Pedriali, Magdalena Lebiedzinska-Arciszewska, Giorgio Aquila, Carlotta Giorgi, et al. 2017. „Mitochondrial permeability transition involves dissociation of F₁F₀ ATP synthase dimers and C-ring conformation". *EMBO reports* 18 (7): 1077–89. <https://doi.org/10.15252/embr.201643602>.
- Bonora, Massimo, M. R. Wieckowski, C. Chinopoulos, O. Kepp, G. Kroemer, L. Galluzzi, a P. Pinton. 2015. „Molecular mechanisms of cell death: Central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition". *Oncogene* 34 (12): 1475–86. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.96>.
- Bragadin, Marco, Tullio Pozzan, a Giovanni Felice Azzzone. 1979. „Kinetics of Ca²⁺ Carrier in Rat Liver Mitochondria⁺". *Biochemistry* 18 (26): 5972–78. <https://doi.org/10.1021/bi00593a033>.
- Brenner, C., a S. Grimm. 2006. „The permeability transition pore complex in cancer cell death". *Oncogene*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209609>.
- Brenner, C., K. Subramaniam, C. Pertuiset, a S. Pervaiz. 2011. „Adenine nucleotide translocase family: Four isoforms for apoptosis modulation in cancer". *Oncogene*. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.501>.
- Broekemeier, K. M., M. E. Dempsey, a D. R. Pfeiffer. 1989. „Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria". *Journal of Biological Chemistry* 264 (14): 7826–30.
- Brown, Maile R., Patrick G. Sullivan, a James W. Geddes. 2006. „Synaptic mitochondria are more susceptible to Ca²⁺ overload than nonsynaptic mitochondria". *Journal of Biological Chemistry* 281 (17): 11658–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510303200>.
- Brustovetsky, Nickolay, a Martin Klingenberg. 1996. „Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺". *Biochemistry* 35 (26): 8483–88. <https://doi.org/10.1021/bi960833v>.
- Brustovetsky, Nickolay, Maximilian Tropschug, Simone Heimpel, Doerthe Heidkämper, a Martin Klingenberg. 2002. „A large Ca²⁺-dependent channel formed by recombinant ADP/ATP carrier from *Neurospora crassa* resembles the mitochondrial permeability transition pore". *Biochemistry* 41 (39): 11804–11. <https://doi.org/10.1021/bi0200110>.
- Carraro, Michela, Vanessa Checchetto, Geppo Sartori, Roza Kucharczyk, Jean Paul Di Rago, Giovanni Minervini, Cinzia Franchin, et al. 2018. „High-conductance channel formation in yeast mitochondria is mediated by F₁F₀ ATP synthase e and g subunits". *Cellular Physiology and Biochemistry* 50 (5): 1840–55. <https://doi.org/10.1159/000494864>.
- Carraro, Michela, Vanessa Checchetto, Ildikó Szabó, a Paolo Bernardi. 2019. „F₁F₀ ATP synthase and the permeability transition pore: fewer doubts, more certainties". *FEBS Letters*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13485>.
- Carraro, Michela, Valentina Giorgio, Justina Sileikyte, Geppo Sartori, Michael Forte, Giovanna Lippe, Mario Zoratti, Ildikó Szabó, a Paolo Bernardi. 2014. „Channel formation by yeast F₁F₀ ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition". *Journal of Biological Chemistry* 289 (23): 15980–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.C114.559633>.
- Carroll, Joe, Jiuya He, Shujing Ding, Ian M. Fearnley, a John E. Walker. 2019. „Persistence of the permeability transition pore in human mitochondria devoid of an assembled ATP synthase". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (26): 12816–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904005116>.
- Cesura, Andrea M., Emmanuel Pinard, Robert Schubanel, Valerie Goetschy, Arno Friedlein, Hanno Langen,

- Peter Polcic, Michael A. Forte, Paolo Bernardi, a John A. Kemp. 2003. „The Voltage-dependent Anion Channel Is the Target for a New Class of Inhibitors of the Mitochondrial Permeability Transition Pore". *Journal of Biological Chemistry* 278 (50): 49812–18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304748200>.
- Cheng, Emily H.Y., Tatiana V. Sheiko, Jill K. Fisher, William J. Craigen, a Stanley J. Korsmeyer. 2003. „VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis". *Science* 301 (5632): 513–17. <https://doi.org/10.1126/science.1083995>.
- Connern, C. P., a A. P. Halestrap. 1994. „Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel". *Biochemical Journal* 302 (2): 321–24. <https://doi.org/10.1042/bj3020321>.
- Costantini, Paola, Raffaele Colonna, a Paolo Bernardi. 1998. „Induction of the mitochondrial permeability transition by N-ethylmaleimide depends on secondary oxidation of critical thiol groups. Potentiation by copper-ortho-phenanthroline without dimerization of the adenine nucleotide translocase". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1365 (3): 385–92. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00090-5).
- Crompton, M., a A. Costi. 1990. „A heart mitochondrial Ca²⁺-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states". *Biochemical Journal* 266 (1): 33–39. <https://doi.org/10.1042/bj2660033>.
- Crompton, Martin, a Andreas Costi. 1988. „Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress: A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload". *European Journal of Biochemistry* 178 (2): 489–501. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14475.x>.
- Crompton, Martin, Heidrun Ellinger, a Andreas Costi. 1988. „Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress The capacity of cyclosporin A to inhibit opening of a Ca²⁺-dependent pore in the inner membrane of heart mitochondria was investigated. Whereas in the presence of 25 nmol of Ca²⁺/mg of mitochondrial protein and 5 mM-P1 mitochondria". *Biochem. J.* Roč. 255.
- Crompton, Martin, Sukaina Virji, Veronica Doyle, Nicholas Johnson, a John M. Ward. 1999. „The mitochondrial permeability transition pore". *Biochemical Society Symposium* 66: 167–79. <https://doi.org/10.1042/bss0660167>.
- Crompton, Martin, Sukaina Virji, a John M. Ward. 1998. „Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore". *European Journal of Biochemistry* 258 (2): 729–35. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2580729.x>.
- Davies, Karen M., Claudio Anselmi, Ilka Wittig, José D. Faraldo-Gómez, a Werner Kühlbrandt. 2012. „Structure of the yeast F₁F₀-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (34): 13602–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204593109>.
- Denicola, Gina M., Florian A. Karreth, Timothy J. Humpton, Aarthi Gopinathan, Cong Wei, Kristopher Frese, Dipti Mangal, et al. 2011. „Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis". *Nature* 475 (7354): 106–10. <https://doi.org/10.1038/nature10189>.
- Denora, Nunzio, a Giovanni Natile. 2017. „An updated view of translocator protein (TSPO)". *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18122640>.
- Dimmer, Kai S., a Luca Scorrano. 2006. „(De)constructing mitochondria: What for?" *Physiology*. Physiology (Bethesda). <https://doi.org/10.1152/physiol.00010.2006>.
- Du, Heng, a Shirley Shi Du Yan. 2010. „Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: Cyclophilin D and amyloid beta". *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. Biochim Biophys Acta. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.07.005>.
- Duchen, Michael R., Orla McGuinness, Leslie A. Brown, a Martin Crompton. 1993. „On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury". *Cardiovascular Research* 27

- (10): 1790–94. <https://doi.org/10.1093/cvr/27.10.1790>.
- Feldmann, Gérard, Delphine Haouzi, Alain Moreau, Anne Marie Durand-Schneider, Annie Bringuier, Alain Berson, Abdellah Mansouri, Daniel Fau, a Dominique Pessayre. 2000. „Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice". *Hepatology* 31 (3): 674–83. <https://doi.org/10.1002/hep.510310318>.
- Fontaine, Eric, Ove Eriksson, François Ichas, a Paolo Bernardi. 1998. „Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria modulation by electron flow through the respiratory chain complex I". *Journal of Biological Chemistry* 273 (20): 12662–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.20.12662>.
- Fournier, N., G. Ducet, a A. Crevat. 1987. „Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes". *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 19 (3): 297–303. <https://doi.org/10.1007/BF00762419>.
- Giorgio, Valentina, Elena Bisetto, Maria Eugenia Soriano, Federica Dabbeni-Sala, Emy Basso, Valeria Petronilli, Michael A. Forte, Paolo Bernardi, a Giovanna Lippe. 2009. „Cyclophilin D modulates mitochondrial FOF1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex". *Journal of Biological Chemistry* 284 (49): 33982–88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.020115>.
- Giorgio, Valentina, Victoria Burchell, Marco Schiavone, Claudio Bassot, Giovanni Minervini, Valeria Petronilli, Francesco Argenton, et al. 2017. „Ca²⁺ binding to F-ATP synthase β subunit triggers the mitochondrial permeability transition". *EMBO reports* 18 (7): 1065–76. <https://doi.org/10.15252/embr.201643354>.
- Giorgio, Valentina, Sophia Von Stockum, Manuela Antoniel, Astrid Fabbro, Federico Fogolari, Michael Forte, Gary D. Glick, et al. 2013. „Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (15): 5887–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217823110>.
- Gouspillou, Gilles, Nicolas Sgarioto, Sophia Kapchinsky, Fennigje Purves-Smith, Brandon Norris, Charlotte H. Pion, Sébastien Barbat-Artigas, et al. 2014. „Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans". *FASEB Journal* 28 (4): 1621–33. <https://doi.org/10.1096/fj.13-242750>.
- Green, Douglas R., Lorenzo Galluzzi, a Guido Kroemer. 2011. „Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging". *Science*. Science. <https://doi.org/10.1126/science.1201940>.
- Grek, Christina L., a Kenneth D. Tew. 2010. „Redox metabolism and malignancy". *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.05.003>.
- Griffiths, Elinor J, a Andrew P Halestrap. 1995. „Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion". *Biochemical Journal* 307 (1): 93–98. <https://doi.org/10.1042/bj3070093>.
- Guo, Lishu, Michela Carraro, Andrea Carrer, Giovanni Minervini, Andrea Urbani, Ionica Masgras, Silvio C.E. Tosatto, Ildikò Szabò, Paolo Bernardi, a Giovanna Lippe. 2019. „Arg-8 of yeast subunit e contributes to the stability of F-ATP synthase dimers and to the generation of the full-conductance mitochondrial megachannel". *Journal of Biological Chemistry* 294 (28): 10987–97. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.008775>.
- Guo, Lishu, Michela Carraro, Geppo Sartori, Giovanni Minervini, Ove Eriksson, Valeria Petronilli, a Paolo Bernardi. 2018. „Arginine 107 of yeast ATP synthase subunit g mediates sensitivity of the mitochondrial permeability transition to phenylglyoxal". *Journal of Biological Chemistry* 293 (38): 14632–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004495>.
- Gutiérrez-Aguilar, Manuel, Diana L. Douglas, Anne K. Gibson, Timothy L. Domeier, Jeffery D. Molkenin, a Christopher P. Baines. 2014. „Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition". *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 72: 316–25. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.04.008>.
- Hahn, Alexander, Kristian Parey, Maike Bubltz, Deryck J. Mills, Volker Zickermann, Janet Vonck, Werner Kühlbrandt, a Thomas Meier. 2016. „Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology". *Molecular Cell* 63 (3): 445–56.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.037>.

- Halestrap, A. P. 1991. „Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic damage". *Biochemical Journal* 278 (3): 715–19. <https://doi.org/10.1042/bj2780715>.
- Halestrap, Andrew, a Catherine Brenner. 2005. „The Adenine Nucleotide Translocase: A Central Component of the Mitochondrial Permeability Transition Pore and Key Player in Cell Death". *Current Medicinal Chemistry* 10 (16): 1507–25. <https://doi.org/10.2174/0929867033457278>.
- Hanahan, Douglas, a Robert A. Weinberg. 2011. „Hallmarks of cancer: The next generation". *Cell*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- Haworth, Robert A., a Douglas R. Hunter. 1979. „The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 195 (2): 460–67. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90372-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90372-2).
- He, Jiuya, Joe Carroll, Shujing Ding, Ian M. Fearnley, a John E. Walker. 2017. „Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (34): 9086–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711201114>.
- He, Jiuya, Holly C. Ford, Joe Carroll, Shujing Ding, Ian M. Fearnley, a John E. Walker. 2017. „Persistence of the mitochondrial permeability transition in the absence of subunit c of human ATP synthase". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (13): 3409–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702357114>.
- He, Lihua, a John J. Lemasters. 2002. „Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: A new paradigm of pore structure and function?" *FEBS Letters* 512 (1–3): 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03314-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03314-2).
- Heiden, Matthew G.Vander, Lewis C. Cantley, a Craig B. Thompson. 2009. „Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation". *Science*. Science. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>.
- Herick, Klaus, Reinhard Krämer, a Hinrich Lühning. 1997. „Patch clamp investigation into the phosphate carrier from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1321 (3): 207–20. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00050-9).
- Hoffmann, Birgit, Andreas Stöckl, Michael Schlame, Klaus Beyer, a Martin Klingenberg. 1994. „The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants". *Journal of Biological Chemistry* 269 (3): 1940–44.
- Hunter, Douglas R., a Robert A. Haworth. 1979a. „The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 195 (2): 453–59. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90371-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90371-0).
- . 1979b. „The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 195 (2): 468–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90373-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90373-4).
- Hunter, F. E., a L. Ford. 1955. „Inactivation of oxidative and phosphorylative systems in mitochondria by preincubation with phosphate and other ions". *The Journal of biological chemistry*. Roč. 216. <http://www.jbc.org/>.
- Ichas, François, Laurence S. Jouaville, a Jean Pierre Mazat. 1997. „Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals". *Cell* 89 (7): 1145–53. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80301-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80301-3).
- Irwin, William A., Natascha Bergamin, Patrizia Sabatelli, Carlo Reggiani, Aram Megighian, Luciano Merlini, Paola Braghetta, et al. 2003. „Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency". *Nature Genetics* 35 (4): 367–71. <https://doi.org/10.1038/ng1270>.

- Jobsis, G. J., H. Keizers, J. P. Vreijling, M. De Visser, M. C. Speer, R. A. Wolterman, F. Baas, a P. A. Bolhuis. 1996. „Type VI collagen mutations in Bethlem myopathy, an autosomal dominant myopathy with contractures". *Nature Genetics* 14 (1): 113–15. <https://doi.org/10.1038/ng0996-113>.
- Jung, Dennis W., Patrick C. Bradshaw, a Douglas R. Pfeiffer. 1997. „Properties of a cyclosporin-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria". *Journal of Biological Chemistry* 272 (34): 21104–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.21104>.
- Keep, Marcus, Eskil Elmér, Keith S.K. Fong, a Katalin Csiszar. 2001. „Intrathecal cyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice". *Brain Research* 894 (2): 327–31. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02012-1).
- King, Michael P., a Giuseppe Attardi. 1989. „Human cells lacking mtDNA: Repopulation with exogenous mitochondria by complementation". *Science* 246 (4929): 500–503. <https://doi.org/10.1126/science.2814477>.
- Kinnally, Kathleen W., Maria Luisa Campo, a Henry Tedeschi. 1989. „Mitochondrial channel activity studied by patch-clamping mitoplasts". *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 21 (4): 497–506. <https://doi.org/10.1007/BF00762521>.
- Kinnally, Kathleen W., Dmitry B. Zorov, Yuri N. Antonenko, Solomon H. Snyder, Maureen W. Mcenery, a Henry Tedeschi. 1993. „Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (4): 1374–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.4.1374>.
- Klingenberg, Martin. 2008. „The ADP and ATP transport in mitochondria and its carrier". *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1778 (10): 1978–2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.04.011>.
- Kokoszka, Jason E., Katrina G. Waymire, Shawn E. Levy, James E. Sligh, Jiyang Cai, Dean P. Jones, Grant R. MacGregor, a Douglas C. Wallace. 2004. „The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore". *Nature* 427 (6973): 461–65. <https://doi.org/10.1038/nature02229>.
- Kowaltowski, Alicia J., Roger F. Castilho, Mercedes T. Grijalba, Etelvino J.H. Bechara, a Anibal E. Vercesi. 1996. „Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions: A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation". *Journal of Biological Chemistry* 271 (6): 2929–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.6.2929>.
- Krauskopf, Alexandra, Ove Eriksson, William J. Craigen, Michael A. Forte, a Paolo Bernardi. 2006. „Properties of the permeability transition in VDAC1-/- mitochondria". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1757 (5–6): 590–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2006.02.007>.
- Kroemer, Guido, Lorenzo Galluzzi, a Catherine Brenner. 2007. „Mitochondrial membrane permeabilization in cell death". *Physiological Reviews*. *Physiol Rev*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>.
- Kwong, J. Q., J. Davis, C. P. Baines, M. A. Sargent, J. Karch, X. Wang, T. Huang, a J. D. Molkentin. 2014. „Genetic deletion of the mitochondrial phosphate carrier desensitizes the mitochondrial permeability transition pore and causes cardiomyopathy". *Cell Death and Differentiation* 21 (8): 1209–17. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.36>.
- Le-Quoc, K., a D. Le-Quoc. 1985. „Crucial role of sulfhydryl groups in the mitochondrial inner membrane structure". *Journal of Biological Chemistry* 260 (12): 7422–28.
- Lehninger, A. L. 1959. „Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate." *The Journal of biological chemistry* 234 (9): 2465–71. <http://www.jbc.org/>.
- Lehninger, A. L., a L. F. Remmert. 1959. „An endogenous uncoupling and swelling agent in liver mitochondria and its enzymic formation." *The Journal of biological chemistry* 234 (9): 2459–64.
- Leist, Marcel, Barbara Single, Anna F. Castoldi, Simone Kühnle, a Pierluigi Nicotera. 1997. „Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis". *Journal of Experimental Medicine* 185 (8): 1481–86. <https://doi.org/10.1084/jem.185.8.1481>.
- Leung, Anna W.C., a Andrew P. Halestrap. 2008. „Recent progress in elucidating the molecular mechanism of

- the mitochondrial permeability transition pore". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.03.009>.
- Leung, Anna W.C., Pinadda Varanyuwatana, a Andrew P. Halestrap. 2008. „The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition". *Journal of Biological Chemistry* 283 (39): 26312–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805235200>.
- Li, Bo, Christiane Chauvin, Damien De Paulis, Frédéric De Oliveira, Abdallah Gharib, Guillaume Vial, Sandrine Lablanche, et al. 2012. „Inhibition of complex I regulates the mitochondrial permeability transition through a phosphate-sensitive inhibitory site masked by cyclophilin D". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1817 (9): 1628–34. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.05.011>.
- Liu, Xuesong, Caryn Naekyung Kim, Jie Yang, Ronald Jemmerson, a Xiaodong Wang. 1996. „Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c". *Cell* 86 (1): 147–57. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80085-9).
- Machida, Kiyotaka, Yoshihiro Ohta, a Hiroyuki Osada. 2006. „Suppression of apoptosis by cyclophilin D via stabilization of hexokinase II mitochondrial binding in cancer cells". *Journal of Biological Chemistry* 281 (20): 14314–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513297200>.
- Masgras, Ionica, Andrea Rasola, a Paolo Bernardi. 2012. „Induction of the permeability transition pore in cells depleted of mitochondrial DNA". In *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817:1860–66. Biochim Biophys Acta. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.02.022>.
- Mathupala, Saroj P., Young H. Ko, a Peter L. Pedersen. 2010. „The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies". *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.025>.
- Mcenery, Maureen W., Adele M. Snowman, Rosario R. Trifiletti, a Solomon H. Snyder. 1992. „Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: Association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (8): 3170–74. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3170>.
- McGeoch, Julie E.M., a Guido Guidotti. 1997. „A 0.1–700 Hz current through a voltage-clamped pore: Candidate protein for initiator of neural oscillations". *Brain Research* 766 (1–2): 188–94. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00618-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00618-5).
- Merlini, Luciano, Alessia Angelin, Tania Tiepolo, Paola Braghetta, Patrizia Sabatelli, Alessandra Zamparelli, Alessandra Ferlini, Nadir M. Maraldi, Paolo Bonaldo, a Paolo Bernardi. 2008. „Cyclosporin A corrects mitochondrial dysfunction and muscle apoptosis in patients with collagen VI myopathies". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (13): 5225–29. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800962105>.
- Mitchell, Peter. 1979. „Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences". *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.388618>.
- Mnatsakanyan, Nelli, Marc C. Llaguno, Youshan Yang, Yangyang Yan, Joachim Weber, Fred J. Sigworth, a Elizabeth A. Jonas. 2019. „A mitochondrial megachannel resides in monomeric F1FO ATP synthase". *Nature Communications* 10 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13766-2>.
- Muñoz-Pinedo, Cristina, Ana Guío-Carrión, Joshua C. Goldstein, Patrick Fitzgerald, Donald D. Newmeyer, a Douglas R. Green. 2006. „Different mitochondrial intermembrane space proteins are released during apoptosis in a manner that is coordinately initiated but can vary in duration". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (31): 11573–78. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603007103>.
- Nakagawa, Takashi, Shigeomi Shimizu, Tetsuya Watanabe, Osamu Yamaguchi, Kinya Otsu, Hirotaka Yamagata, Hidenori Inohara, Takeshi Kubo, a Yoshihide Tsujimoto. 2005. „Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death". *Nature* 434 (7033): 652–58. <https://doi.org/10.1038/nature03317>.
- Neginskaya, Maria A., Maria E. Solesio, Elena V. Berezhnaya, Giuseppe F. Amodeo, Nelli Mnatsakanyan,

- Elizabeth A. Jonas, a Evgeny V. Pavlov. 2019. „ATP Synthase C-Subunit-Deficient Mitochondria Have a Small Cyclosporine A-Sensitive Channel, but Lack the Permeability Transition Pore". *Cell Reports* 26 (1): 11-17.e2. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.033>.
- Nicholls, D. G. 1978. „The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria." *The Biochemical journal* 176 (2): 463–74. <https://doi.org/10.1042/bj1760463>.
- Nicolli, Annamaria, Emy Basso, Valeria Petronilli, Roland M. Wenger, a Paolo Bernardi. 1996. „Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel". *Journal of Biological Chemistry* 271 (4): 2185–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.4.2185>.
- Nicolli, Annamaria, Valeria Petronilli, a Paolo Bernardi. 1993. „Modulation of the Mitochondrial Cyclosporin A-Sensitive Permeability Transition Pore by Matrix pH. Evidence That the Pore Open-Closed Probability Is Regulated by Reversible Histidine Protonation". *Biochemistry* 32 (16): 4461–65. <https://doi.org/10.1021/bi00067a039>.
- Nůsková, Hana, Tomáš Mráček, Tereza Mikulová, Marek Vrbacký, Nikola Kovářová, Jana Kovalčíková, Petr Pecina, a Josef Houštěk. 2015. „Mitochondrial ATP synthasome: Expression and structural interaction of its components". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464 (3): 787–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.034>.
- Palmieri, Ferdinando. 2004. „The mitochondrial transporter family (SLC25): Physiological and pathological implications". *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. Pflügers Arch. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1099-7>.
- Pantic, B., E. Trevisan, A. Citta, M. P. Rigobello, O. Marin, P. Bernardi, S. Salvatori, a A. Rasola. 2013. „Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) prevents ROS-induced cell death by assembling a hexokinase II-Src complex on the mitochondrial surface". *Cell Death and Disease* 4 (10). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.385>.
- Papa, Sergio, Pietro Luca Martino, Giuseppe Capitanio, Antonio Gaballo, Domenico De Rasmio, Anna Signorile, a Vittoria Petruzzella. 2012. „The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria". *Advances in Experimental Medicine and Biology* 942: 1–37. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_1.
- Parker, Mark A., Haydee E.P. Bazan, Victor Marcheselli, Elena B. De Rodriguez Turco, a Nicolas G. Bazan. 2002. „Platelet-activating factor induces permeability transition and cytochrome c release in isolated brain mitochondria". *Journal of Neuroscience Research* 69 (1): 39–50. <https://doi.org/10.1002/jnr.10235>.
- Pastorino, John G., Ausra Marcineviciute, Alan Cahill, a Jan B. Hoek. 1999. „Potentiation by chronic ethanol treatment of the mitochondrial permeability transition". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 265 (2): 405–9. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1696>.
- Pereira, Gonçalo C., Laura Lee, Nadiia Rawlings, Joke Ouwendijk, Joanne E. Parker, Tatyana N. Andrienko, Jeremy M. Henley, a Andrew P. Halestrap. 2020. „Hexokinase II dissociation alone cannot account for changes in heart mitochondrial function, morphology and sensitivity to permeability transition pore opening following ischemia". *PLoS ONE* 15 (6): e0234653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234653>.
- Petronilli, Valeria, Ildiko Szabó, a Mario Zoratti. 1989. „The inner mitochondrial membrane contains ion-conducting channels similar to those found in bacteria". *FEBS Letters* 259 (1): 137–43. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81513-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81513-3).
- Pfeiffer, D. R., T. H. Kuo, a T. T. Tchen. 1976. „Some effects of Ca²⁺, Mg²⁺, and Mn²⁺ on the ultrastructure, light-scattering properties, and malic enzyme activity of adrenal cortex mitochondria". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 176 (2): 556–63. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90199-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90199-5).
- Pinto, Vito De, a Ferdinando Palmieri. 1992. „Transmembrane arrangement of mitochondrial porin or voltage-dependent anion channel (VDAC)". *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 24 (1): 21–26. <https://doi.org/10.1007/BF00769526>.
- Pinton, Paolo, Anna Romagnoli, Rosario Rizzuto, a Carlotta Giorgi. 2008. „Ca²⁺ Signaling, Mitochondria and Cell

- Death". *Current Molecular Medicine* 8 (2): 119–30. <https://doi.org/10.2174/156652408783769571>.
- Porter, George A., a Gisela Beutner. 2018. „Cyclophilin D, somehow a master regulator of mitochondrial function". *Biomolecules*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom8040176>.
- Raaflaub, J. 1953. „[Swelling of isolated mitochondria of the liver and their susceptibility to physicochemical influences]". *Helvetica physiologica et pharmacologica acta* 11 (2): 142–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13095885>.
- Rasola, Andrea, a Paolo Bernardi. 2007. „The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis". *Apoptosis*. Apoptosis. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0723-y>.
- Rehling, Peter, Kirstin Model, Katrin Brandner, Peter Kovermann, Albert Sickmann, Helmut E. Meyer, Werner Kühlbrandt, Richard Wagner, Kaye N. Truscott, a Nikolaus Pfanner. 2003. „Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase". *Science* 299 (5613): 1747–51. <https://doi.org/10.1126/science.1080945>.
- Ricci, Jean Ehrland, Cristina Muñoz-Pinedo, Patrick Fitzgerald, Béatrice Bailly-Maitre, Guy A. Perkins, Nagendra Yadava, Immo E. Scheffler, Mark H. Ellisman, a Douglas R. Green. 2004. „Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain". *Cell* 117 (6): 773–86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.008>.
- Rizzuto, Rosario, Marisa Brini, Marta Murgia, a Tullio Pozzan. 1993. „Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria". *Science* 262 (5134): 744–47. <https://doi.org/10.1126/science.8235595>.
- Robey, R. B., a N. Hay. 2006. „Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt". *Oncogene*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209595>.
- Rottenberg, Hagai, a Miriam Marbach. 1990a. „Regulation of Ca²⁺ transport in brain mitochondria. I. The mechanism of spermine enhancement of Ca²⁺ uptake and retention". *BBA - Bioenergetics* 1016 (1): 77–86. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90009-S](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90009-S).
- . 1990b. „Regulation of Ca²⁺ transport in brain mitochondria. II. The mechanism of the adenine nucleotides enhancement of Ca²⁺ uptake and retention". *BBA - Bioenergetics* 1016 (1): 87–98. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(90\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(90)90010-2).
- Rück, Alexander, Max Dolder, Theo Wallimann, a Dieter Brdiczka. 1998. „Reconstituted adenine nucleotide translocase forms a channel for small molecules comparable to the mitochondrial permeability transition pore". *FEBS Letters* 426 (1): 97–101. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00317-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00317-2).
- Scarpa, Antonio, a John G. Lindsay. 1972. „Maintenance of Energy-Linked Functions in Rat-Liver Mitochondria Aged in the Presence of Nupercaine". *European Journal of Biochemistry* 27 (3): 401–7. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb01851.x>.
- Schlame, Michael, Klaus Beyer, Manajit Hayer-Hartl, a Martin Klingenberg. 1991. „Molecular species of cardiolipin in relation to other mitochondrial phospholipids: Is there an acyl specificity of the interaction between cardiolipin and the ADP/ATP carrier?" *European Journal of Biochemistry* 199 (2): 459–66. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16144.x>.
- Schultheiss, Heinz Peter, a Martin Klingenberg. 1984. „Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator: Organ specificity and conformation specificity". *European Journal of Biochemistry* 143 (3): 599–605. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08412.x>.
- Šileikyte, Justina, Elizabeth Blachly-Dyson, Randall Sewell, Andrea Carpi, Roberta Menabò, Fabio Di Lisa, Fernanda Ricchelli, Paolo Bernardi, a Michael Forte. 2014. „Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by the outer membrane does not involve the peripheral benzodiazepine receptor (translocator protein of 18 kDa (TSPO))". *Journal of Biological Chemistry* 289 (20): 13769–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.549634>.
- Slater, E. C., a K. W. Cleland. 1953. „The effect of calcium on the respiratory and phosphorylative activities of

- heart-muscle sarcosomes". *The Biochemical journal* 55 (4): 566–90. <https://doi.org/10.1042/bj0550566>.
- Sorgato, M. Catia, Bernhard U. Keller, a Walter Stühmer. 1987. „Patch-clamping of the inner mitochondrial membrane reveals a voltage-dependent ion channel". *Nature* 330 (6147): 498–500. <https://doi.org/10.1038/330498a0>.
- Soriano, Maria Eugenia, Luca Nicolosi, a Paolo Bernardi. 2004. „Desensitization of the permeability transition pore by cyclosporin A prevents activation of the mitochondrial apoptotic pathway and liver damage by tumor necrosis factor- α ". *Journal of Biological Chemistry* 279 (35): 36803–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405297200>.
- Stanhope, K. J., N. R. Mirza, M. J. Bickerdike, J. L. Bright, N. R. Harrington, M. B. Hesselink, G. A. Kennett, et al. 2001. „Toxicity of alpidem, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, but not zolpidem, in rat hepatocytes: Role of mitochondrial permeability transition and metabolic activation". *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299 (2): 793–800. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11602696/>.
- Starkov, Anatoly A. 2008. „The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling". In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147:37–52. Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.015>.
- Stockum, Sophia Von, Emy Basso, Valeria Petronilli, Patrizia Sabatelli, Michael A. Forte, a Paolo Bernardi. 2011. „Properties of Ca²⁺ transport in mitochondria of *Drosophila melanogaster*". *Journal of Biological Chemistry* 286 (48): 41163–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.268375>.
- Stockum, Sophia Von, Valentina Giorgio, Elena Trevisan, Giovanna Lippe, Gary D. Glick, Michael A. Forte, Caterina Da-Rè, et al. 2015. „F-ATPase of *drosophila melanogaster* forms 53-picosiemen (53-pS) channels responsible for mitochondrial Ca²⁺-induced Ca²⁺ release". *Journal of Biological Chemistry* 290 (8): 4537–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.C114.629766>.
- Szabo, I., P. Bernardi, a M. Zoratti. 1992. „Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons". *Journal of Biological Chemistry* 267 (5): 2940–46. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1371109/>.
- Szabo, Ildiko, a M. Zoratti. 1991. „The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A". *Journal of Biological Chemistry* 266 (6): 3376–79.
- Szabó, Ildikó, Vito De Pinto, a Mario Zoratti. 1993. „The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel". *FEBS Letters* 330 (2): 206–10. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80274-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80274-X).
- Szabó, Ildikó, a Mario Zoratti. 1992. „The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore". *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 24 (1): 111–17. <https://doi.org/10.1007/BF00769537>.
- . 1993. „The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore". *FEBS Letters* 330 (2): 201–5. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80273-W](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80273-W).
- Tait, Stephen W.G., a Douglas R. Green. 2013. „Mitochondrial regulation of cell death". *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008706>.
- Takahashi, K. 1968. „The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins." *Journal of Biological Chemistry* 243 (23): 6171–79. <https://www.jbc.org/content/243/23/6171.abstract>.
- Tapley, D. F. 1956. „The effect of thyroxine and other substances on the swelling of isolated rat liver mitochondria". *The Journal of biological chemistry* 222 (1): 325–39.
- Teckman, Jeffrey H., Jae Koo An, Keith Blomenkamp, Bela Schmidt, a David Perlmutter. 2004. „Mitochondrial autophagy and injury in the liver in α 1-antitrypsin deficiency". *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 286 (5 49-5). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00175.2003>.

- Terman, Alexei, a Ulf T. Brunk. 2004. „Myocyte aging and mitochondrial turnover". *Experimental Gerontology*. Exp Gerontol. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.01.005>.
- Trachootham, Dunyaporn, Jerome Alexandre, a Peng Huang. 2009. „Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach?" *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd2803>.
- Urbani, Andrea, Valentina Giorgio, Andrea Carrer, Cinzia Franchin, Giorgio Arrigoni, Chimari Jiko, Kazuhiro Abe, et al. 2019. „Purified F-ATP synthase forms a Ca²⁺-dependent high-conductance channel matching the mitochondrial permeability transition pore". *Nature Communications* 10 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12331-1>.
- Vanegas, Olga Camacho, Enrico Bertini, Rui Zhu Zhang, Stefania Petrini, Claudia Minosse, Patrizia Sabatelli, Betti Giusti, Mon Li Chu, a Guglielmina Pepe. 2001. „Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (13): 7516–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.121027598>.
- Varanyuwatana, Pinadda, a Andrew P. Halestrap. 2012. „The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore". *Mitochondrion* 12 (1): 120–25. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.04.006>.
- Vinogradov, A., A. Scarpa, a B. Chance. 1972. „Calcium and pyridine nucleotide interaction in mitochondrial membranes". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 152 (2): 646–54. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(72\)90261-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(72)90261-5).
- Walker, John E. 2013. „The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown". *Biochemical Society Transactions* 41 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1042/BST20110773>.
- Waterhouse, Nigel J., Joshua C. Goldstein, Oliver Von Ahsen, Martin Schuler, Donald D. Newmeyer, a Douglas R. Green. 2001. „Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process". *Journal of Cell Biology* 153 (2): 319–28. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.2.319>.
- Wei, M. C., W. X. Zong, E. H.Y. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. Macgregor, C. B. Thompson, a S. J. Korsmeyer. 2001. „Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death". *Science* 292 (5517): 727–30. <https://doi.org/10.1126/science.1059108>.
- Woodfield, Kuei, Alexander Rück, Dieter Brdiczka, a Andrew P. Halestrap. 1998. „Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition". *Biochemical Journal* 336 (2): 287–90. <https://doi.org/10.1042/bj3360287>.
- Yoshida, Makoto, Kazuhiko Sekiyama, Kazuaki Inoue, a Rikiya Fujita. 1995. „Interferon and cyclosporin A in the treatment of fulminant viral hepatitis". *Journal of Gastroenterology* 30 (1): 67–73. <https://doi.org/10.1007/BF01211377>.
- Zoratti, Mario, a Ildikò Szabò. 1995. „The mitochondrial permeability transition". *BBA - Reviews on Biomembranes* 1241 (2): 139–76. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(95\)00003-A](https://doi.org/10.1016/0304-4157(95)00003-A).